



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS

itqb

UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

4nFCT
ANOS
FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



DESDE 1962
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Deteção e identificação de bactérias do género *Leptospira* em amostras ambientais e em pequenos mamíferos, de dois distritos de Portugal, através de abordagens moleculares

Filipe Fernandes Delgado

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Janeiro 2020



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Deteção e identificação de bactérias do género *Leptospira* em amostras ambientais e em pequenos mamíferos, de dois distritos de Portugal, através de abordagens moleculares

Filipe Fernandes Delgado

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadora: Doutora Maria Luísa Vieira, Investigadora Auxiliar e Responsável do Lab. de Leptospirose e Borreliose de Lyme (LLBL), Unidade de Microbiologia Médica (UMM) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa.

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Unidade de Microbiologia Médica /Lab. de Leptospirose e Borreliose de Lyme

Janeiro, 2020

Parte dos resultados decorrentes da presente Dissertação foram apresentados nos seguintes Congressos, Conferências e/ou Seminários científicos:

- Maria Fernandes*, **Filipe Delgado**, Teresa Carreira, Rosa Teodósio, Maria Luísa Vieira. (2019). “*Leptospira* spp. em coleções de água doce me Portugal: Novos Desafios”. Apresentado no 8.º Congresso em Pandemias na Era da Globalização, Hotel Vila Galé, Coimbra, Portugal, de 30 e 31 de abril’19.
[Poster 1º autor]
- Maria Fernandes*, **Filipe Delgado**, Teresa Carreira, Rosa Teodósio, Maria Luísa Vieira. (2019) “*Leptospira* spp. in freshwater collections from Portugal: New challenges”. Apresentado na 11th International Leptospirosis Conference, organized by International Leptospirosis Society (ILS), Vancouver, Canada, de 8 a 12 de julho’19.
[comunicação oral 1º autor]
- Maria Fernandes*, **Filipe Delgado**, Teresa Carreira, Rosa Teodósio, Maria Luísa Vieira. (2019). “*Leptospira* spp., in Rodents, Soils and Freshwater Collections”. Apresentado no Seminário organizado pela School of Veterinary Science Seminar Series 2019, Massey University, Nova Zelândia, em 14 de agosto de 2019.
[comunicação oral 1º autor]
- Maria Fernandes*, **Filipe Delgado**, Teresa Carreira, Rosa Teodósio, Maria Luísa Vieira. (2019). “*Leptospira* spp., in soils and freshwater collections: a public health concern”. Apresentado na International Conference on Environmental Health - "New" Challenges for the Future. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Lisboa, Portugal, de 25 a 27 de setembro’19.
[comunicação oral 1º autor]
- Maria Fernandes*, **Filipe Delgado**, Teresa Carreira, Rosa Teodósio, Maria Luísa Vieira. (2019). “*Leptospira* spp. in soils and freshwater collections: a public health problem?”. Apresentado no Congresso Microbiotec’19, numa organização conjunta da Sociedade Portuguesa de Microbiologia (SPM) e Sociedade Portuguesa de Biotecnologia (SPBT). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, de 5 a 7 de dezembro’19.
[Poster 1º autor]
- Teresa Carreira*, Maria Fernandes, **Filipe Delgado**, Rosa Teodósio, Maria Luísa Vieira. (2019). “Rodents and leptospires: from the old relationship to the current challenges”. Apresentado no Congresso Microbiotec’19, numa organização conjunta da Sociedade Portuguesa de Microbiologia (SPM) e Sociedade Portuguesa de Biotecnologia (SPBT). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, de 5 a 7 de dezembro’19.
[Poster 1º autor]

AGRADECIMENTOS

Antes de proceder aos agradecimentos gostaria de referir que a realização deste Mestrado foi, desde o primeiro dia, um grande desafio para mim. Primeiramente, pelo facto de ter sido eu a financiar todos os custos inerentes ao Mestrado e, para que isso fosse possível, o mesmo foi realizado ao mesmo tempo que trabalhava a tempo inteiro no Biotério de Roedores do Instituto de Medicina Molecular (IMM). Em segundo lugar, e devido ao facto de estar a trabalhar, não me foi possível participar, desde início, nos módulos lecionados neste Mestrado, o que dificultou muito a minha aprendizagem. Por último, o arranque da realização desta Dissertação não foi o mais feliz, uma vez que, depois de ter aceite o convite para a realização da mesma num laboratório do Instituto de Medicina Molecular, onde o projeto estava, inclusive, validado pela comissão científica do Mestrado em Microbiologia Médica, foi-me comunicado, por parte do laboratório do IMM, que não poderia realizar o referido projeto.

Felizmente, todas estas adversidades foram ultrapassadas, não sozinho, mas sim com todos aqueles que me ajudaram a concretizar este objetivo. Neste sentido quero agradecer, em primeiro lugar, às pessoas que trabalharam diretamente comigo no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme:

À Investigadora Doutora Maria Luísa Vieira, por me ter recebido no seu laboratório, por toda a sua disponibilidade, preocupação, interesse, todas as explicações e chamadas de atenção que me fizeram crescer não só cientificamente, mas também enquanto pessoa.

À Técnica Superior e Mestre Teresa Carreira, por toda a sua disponibilidade, ajuda e boa disposição que foram muito importantes para que eu conseguisse realizar as tarefas laboratoriais.

Um especial agradecimento à Mestre Maria Oliveira Fernandes, pela possibilidade de me integrar no seu trabalho de Doutoramento, pelos fins-de-semana inteiros a recolher amostras ambientais, pelas noites “em claro” para capturar roedores, pelas horas exaustivas passadas no laboratório e por me ter acompanhado e ajudado em tudo o que foi possível neste último ano.

À Mestre e também doutoranda Iara Jaintilal, no referido laboratório, pela explicação e ajuda que me deu na construção de árvores filogenéticas, incluindo a apresentada neste trabalho.

Em segundo lugar, gostaria de deixar o meu agradecimento às pessoas que, indiretamente, me ajudaram a conseguir completar este objetivo:

À minha Família, pelo apoio incondicional que me deu ao longo destes dois anos, pela atenção, preocupação e ajuda que foram fundamentais para que a realização deste mestrado fosse possível.

À Gestora do Biotério de Roedores do Instituto de Medicina Molecular, Iolanda Moreira, por me ter proporcionado melhores condições de trabalho de acordo com as minhas necessidades, para que me pudesse concentrar no Mestrado e por todo o apoio, preocupação e consideração que teve para comigo nestes últimos dois anos.

A todos os meus amigos, pela compreensão e mensagens de apoio que me fizeram chegar e, que foram, de tal forma importantes, que permitiram que nunca desistisse.

Por fim, quero agradecer à Comissão Científica da presente edição do Mestrado, pela permissão de alterações que foram feitas no tema da minha Dissertação e pela consideração que sempre senti no que diz respeito ao meu caso particular.

A todas estas pessoas, o meu grande e sincero obrigado!

RESUMO

A leptospirose é uma doença infecciosa zoonótica, emergente e de distribuição mundial, causada por espiroquetas patogénicas do género *Leptospira*. Os roedores são os principais reservatórios destas bactérias, disseminando-as no ambiente através da urina, onde podem sobreviver semanas ou meses em coleções de água doce e solos húmidos. É assim, importante conhecer a distribuição geográfica de *Leptospira* spp., bem como a respetiva taxa bacteriana.

Assim, em dois distritos de Portugal (Lisboa e Setúbal), colheram-se 327 amostras de água (lagos, rios, fontes públicas e bebedouros), 96 amostras de solo, e 139 amostras biológicas (sangue, urina, fígado, rim, pulmão e baço) obtidas de 18 roedores capturados nas proximidades dos locais de colheita das amostras ambientais. Todas as amostras (solos, águas e órgãos/roedores) foram sujeitas a extração de DNA genómico. Para amplificação do DNA, usaram-se dois protocolos de *nested*-PCR primeiramente com *primers* universais, baseados no gene *rrs* (16S) para o género *Leptospira*, e depois *primers* específicos para espécies patogénicas, tendo como alvo o gene *lipL32*. Alguns dos produtos amplificados foram sequenciados e analisados por BLAST.

Os *primers* universais detetaram DNA leptospírico em 49% (159⁺/327) das amostras de água, 83% (80⁺/96) das amostras de solo, e 44% (56⁺/127) nas amostras de roedores. O rim e o fígado foram os órgãos com maior taxa bacteriana (65% e 67%) respetivamente. Por sua vez, a *nested*-PCR 'lipL32' amplificou DNA de leptospiros patogénicas em 35% das amostras de água (55⁺/159), 9% dos solos (7⁺/80), e em 79% das amostras de roedores (44⁺/56). Os resultados da sequenciação mostraram a prevalência de duas espécies patogénicas, *Leptospira interrogans* e *L. borgpetersenii*.

Estes resultados confirmaram a presença expectável de leptospiros patogénicas nos roedores, mas surpreendentemente também em coleções de água doce e solos, cujos ambientes podem constituir um risco para a saúde das populações expostas aos referidos agentes infecciosos quer em atividades profissionais quer de lazer.

Palavras chave: *Leptospira* spp.; *lipL32*; Amostras de água; Amostras de solos; Roedores.

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide emerging zoonotic infectious disease caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. Rodents are the main reservoirs of this bacterium, spreading it through the urine into the environment, where they can survive weeks or months in freshwater collections and wet soils. It is therefore essential to know the geographical distribution of *Leptospira* spp., as well as its bacterial rate.

Thus, in two districts of Portugal (Lisbon and Setubal), 327 water samples (lakes, rivers, public sources and drinking fountains), 96 soil samples and 139 biological samples (blood, urine, liver, kidney, lung and spleen) obtained from 18 rodents captured near the environmental sampling sites already mentioned. All samples (soil, water and rodent'organs) were submitted to genomic DNA extraction. For DNA amplification, two nested-PCR protocols were used, first with universal primers based on the *rrs* (16S) gene for the genus *Leptospira* and then with specific primers (pathogenic species) targeting the *lipL32* gene. Some of the amplified products were sequenced and analyzed by BLAST.

Universal primers detected leptospiral DNA in 49% (159⁺/327) of water samples, 83% (80⁺/96) of soils and in 44% (56⁺/127) of rodent samples. Rodent kidney and liver were the organs with the highest bacterial rate (65% and 67%) respectively. In turn, nested-PCR 'lipL32' amplified DNA from pathogenic leptospires in 35% of water samples (55⁺/159), 9% of soils (7⁺/80), and in 79% of rodent samples (44⁺/56). The sequencing results showed the prevalence of two pathogenic species, *Leptospira interrogans* and *L. borgpetersenii*.

These results confirmed the expected presence of pathogenic leptospires in rodents, but surprisingly also in freshwater collections and soils, whose environments may pose a health risk to populations exposed to such infectious agents in both professional and leisure activities.

Keywords: *Leptospira* spp.; *lipL32*; water samples; soil samples; rodents.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE QUADROS.....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xv

I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Leptospiras e leptospirose.....	1
1.1.1 - Biologia de <i>Leptospira</i> spp.....	1
1.1.2 - Taxonomia e Classificação.....	2
1.1.3 - <i>Leptospira</i> spp. - Ciclo zoonótico	3
1.1.3.1 - Roedores como principais reservatórios	5
1.1.3.2 - A importância do ambiente.....	8
1.1.3.3 - Transmissão aos humanos.....	8
1.2 - Epidemiologia/Distribuição.....	9
1.2.1 - A leptospirose no Mundo.....	9
1.2.2 - A leptospirose em Portugal.....	11
1.3 - Patogénese	13
1.3.1 - Infecção e Resposta imune	13
1.3.2 - Leptospirose anictérica	14
1.3.3 - Síndrome de Weil (leptospirose ictérica).....	15
1.4 - Diagnóstico laboratorial.....	15
1.4.1 - Métodos diretos.....	17
1.4.1.1 - Microscopia em fundo escuro.....	17
1.4.1.2 - Exame cultural em meio seletivo EMJH	18
1.4.1.3 – Amplificação de DNA (PCR).....	19
1.4.2 - Métodos indiretos.....	20
1.4.2.1 - Testes de Rastreio.....	20
1.5 - Prevenção e Controlo.....	22
1.6 - Justificação do tema da Dissertação.....	23

1.6.1 - Objetivos.....	24
II MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
A - Componente de campo.....	25
2.1 - Área geográfica do estudo.....	25
2.2 - Procedimentos legais e éticos para prospeção de amostras ambientais e de roedores.....	26
2.3 - Locais de amostragem e material coletado.....	27
2.4 - Coleções de água doce.....	27
2.4.1 - Calendarização e metodologia para a obtenção de amostras de água.....	27
2.5 - Solos.....	29
2.5.1 - Calendarização e metodologia para a obtenção de amostras de solo.....	29
2.6 - Roedores.....	31
2.6.1- Calendarização e metodologia para a captura de roedores.....	31
2.6.2 – Eutanásia e necropsia.....	32
B – Componente laboratorial	34
2.7 - Extração de DNA genómico.....	34
2.7.3 - Amostras de água.....	34
2.7.2 - Amostras de solo.....	35
2.7.3 - Amostras biológicas (roedores).....	37
2.8 - Amplificação de DNA leptospírico.....	38
2.8.1 - Teste de sensibilidade.....	38
2.8.2 - Teste de especificidade.....	39
2.8.3 - Amplificação de DNA de amostras de águas e solos.....	39
2.8.3.1- <i>Nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B).....	39
2.8.3.2- <i>Nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	40
2.8.4 - Amplificação de DNA de amostras de órgãos e fluidos biológicos.....	41
2.8.4.1 - <i>Nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B).....	41
2.8.4.2 - <i>Nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	42
2.9 - Cultura de tecido renal em meio seletivo EMJH.....	42
2.10 - Sequenciação do DNA de <i>Leptospira</i> spp.....	43
2.11 - Análise de resultados.....	44

III. Resultados	45
3.1 - Sensibilidade e especificidade dos protocolos de nested-PCR	45
3.2 - Amostras de água.....	45
3.2.1 - Coleções de água.....	45
3.2.2 - Parâmetros físico-químicos.....	46
3.2.3 - Amplificação de DNA leptospírico com <i>primers</i> universais (A e B).....	48
3.2.4 - Amplificação de DNA leptospírico com <i>primers</i> específicos “LipL32”	50
3.2.5 - Tratamento estatístico.....	53
3.3 - Amostras de solo.....	54
3.3.1 - Coleções de solos.....	54
3.3.2 - Parâmetros físico-químicos.....	54
3.3.3 - Amplificação de DNA leptospírico com <i>primers</i> universais (A e B).....	57
3.3.4 - Amplificação de DNA leptospírico com <i>primers</i> específicos “LipL32”	59
3.3.5 - Tratamento estatístico.....	62
3.4 - Amostras biológicas de roedores.....	62
3.4.1 - Captura de roedores.....	62
3.4.2 - Parâmetros morfológicos dos roedores.....	64
3.4.3 - Amostras biológicas recolhidas.....	64
3.4.4 - Amplificação de DNA leptospírico com <i>primers</i> universais (A e B).....	65
3.4.5 - Amplificação de DNA leptospírico com <i>primers</i> específicos “LipL32”	67
3.4.6 - Cultura em meio seletivo EMJH.....	69
3.5 - Sequenciação das amostras de água, solo e de amostras biológicas (roedores).....	69
IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	72
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
VI. ANEXOS.....	84
ANEXO I [Autorização Ética (CEFCM) e Legal (ICNF) para a realização deste estudo].....	85
ANEXO II [Resultados da análise das sequenciações no BLAST].....	90
ANEXO II [Exemplar da tabela, utilizada em trabalho de campo, para a anotação das características no momento da colheita das amostras de água].....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Microfotografia eletrónica de <i>Leptospira</i> spp.....	1
Figura 1.2 - Ciclo zoonótico de transmissão das leptospiros.....	4
Figura 1.3 - Exemplo de roedor responsável pela potencial disseminação de leptospiros no ambiente.....	6
Figura 1.4 - Comparação das principais características morfológicas das espécies <i>Rattus rattus</i> e <i>Rattus norvegicus</i>	7
Figura 1.5 - Radiografia ao tórax evidenciando pneumonia por leptospirose.....	14
Figura 1.6 . Representação de crescimento bacteriano (<i>Leptospira</i> spp.) em meio de cultura (EMJH semi-sólido).....	19
Figura 1.7 - Aspeto dos tipos de reação antígeno-anticorpo, observadas em microscopia de fundo escuro...	21
Figura 2.1 - Representação gráfica dos distritos selecionados (Lisboa e Setúbal) com indicação dos locais onde foram recolhidas as amostras de água e solos, e realizada a captura de roedores.....	26
Figura 2.2 - Exemplos de locais onde foram realizadas recolhas de amostras de água doce.....	28
Figura 2.3 - <i>Kit's</i> utilizados para a medição do pH e dos Nitritos.....	29
Figura 2.4 – Exemplos de locais onde foram realizadas recolhas de amostras de solo.....	30
Figura 2.5 - Exemplificação de locais onde foram colocadas armadilhas para a captura de roedores.....	31
Figura 2.6 - Observação de armadilhas com a presença de roedores.....	32
Figura 2.7 - Exemplo de um dos roedores capturados dentro da caixa estanque utilizada para a eutanásia...	32
Figura 2.8 - Exemplo de pesagem de um espécime <i>Mus musculus</i> capturado.....	33
Figura 2.9 - Exemplo de recolha de sangue por punção cardíaca em <i>Mus musculus</i>	33
Figura 2.10 - Necropsia para recolha de órgãos em <i>Mus musculus</i>	33
Figura 2.11 - Exemplos de amostras de solo recolhidos antes do início de extração de DNA.....	35
Figura 2.12 - Exemplo de pesagem do rim de um dos roedores capturado e porção utilizada no protocolo de extração de DNA.....	37
Figura 2.13 - Presença de tecido renal de roedor colocado em saco <i>Stomacher</i> ®.....	43
Figura 3.1 - Representação da sensibilidade e especificidade da técnica de <i>nested</i> -PCR para amplificação de DNA com os <i>primers</i> “LipL32”	45
Figura 3.2 - Representação gráfica do total de amostras (N=327) <i>versus</i> o valor de pH registado nas coleções de água avaliadas nos distritos de Lisboa e Setúbal.....	47
Figuras 3.3 - Representação gráfica da percentagem de amostras de água de acordo com o valor de pH, considerando o total de amostras (N=327).....	47
Figuras 3.4 - Representação gráfica da percentagem de água das amostras recolhidas de acordo com a sua tipologia e respetivo distrito.....	48

Figura 3.5 - Observação de um gel de eletroforese de amostras de água após amplificação por <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B).....	48
Figura 3.6 - Representação gráfica das amostras de água onde se observou amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp., pela <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B) <i>versus</i> as amostras onde não foi detetado DNA da referida bactéria.....	49
Figura 3.7 - Representação gráfica dos resultados obtidos nas amostras que foram submetidas ao protocolo de <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B) referentes aos dois distritos (Lisboa e Setúbal).....	50
Figura 3.8 - Observação de um gel de eletroforese de amostras de água após amplificação por <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	50
Figura 3.9 - Representação gráfica dos resultados totais da amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp., nas amostras de água avaliadas pela <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	51
Figura 3.10 - Representação gráfica dos resultados das amostras provenientes do distrito de Lisboa que foram avaliadas pela <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	52
Figura 3.11 - Representação gráfica dos resultados das amostras do Distrito de Setúbal que foram submetidas ao protocolo de <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	53
Figura 3.12 - Representação gráfica do total de amostras de solo ($N_{\text{solo}}=96$) <i>versus</i> o valor de pH registado de acordo com o distrito de proveniência.....	55
Figura 3.13 - Representação gráfica da distribuição percentual de amostras de solo de acordo com o valor de pH, no total de amostras ($N_{\text{solo}}=96$).....	55
Figura 3.14 - Representação gráfica do nível de humidade registado nas amostras de solo por distrito e de acordo com a seguinte notação: 1 – seco; 2 - pouco húmido; 3 – húmido; 4 – muito húmido; 5- molhado.....	56
Figura 3.15 - Representação gráfica da distribuição do total de amostras por nível de humidade registado nas amostras de acordo com a notação adotada: 1 – seco; 2 - pouco húmido; 3 – húmido; 4 – muito húmido; 5- molhado.....	56
Figura 3.16 - Observação de um gel de eletroforese de amostras de solo após amplificação por <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B).....	57
Figura 3.17 - Representação gráfica dos resultados das amostras de solo de acordo com a amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp., obtidos, após análise da <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i>	

universais (A e B).....	58
Figura 3.18 - Representação gráfica dos resultados obtidos por amplificação de DNA leptospírico nas amostras de solo no distrito de Lisboa, analisadas pela <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B).....	58
Figura 3.19 - Representação gráfica dos resultados obtidos por amplificação de DNA leptospírico nas amostras de solo no distrito de Setúbal, analisadas pela <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B).....	59
Figura 3.20 - Observação de um gel de eletroforese com amostras de solo após amplificação por <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	59
Figura 3.21 - Representação gráfica dos resultados totais, das amostras de solo, que foram analisadas pelo protocolo de <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	60
Figura 3.22 – Representação gráfica da deteção de DNA para espécies patogénicas de <i>Leptospira</i> , obtidos nas amostras (distritos de Lisboa e Setúbal) após análise pela <i>nested</i> -PCR para “LipL32”	61
Figura 3.23 – Representação gráfica da deteção de DNA para espécies patogénicas de <i>Leptospira</i> , obtidos nas amostras (distritos de Lisboa e Setúbal) após análise pela <i>nested</i> -PCR para “LipL32”	61
Figura 3.24 – Representação gráfica da distribuição dos espécimes (roedores) capturados por espécie e por distrito.....	63
Figura 3.25 – Representação gráfica da distribuição de espécimes (roedores) capturados por local de captura.....	63
Figura 3.26 - Representação gráfica da distribuição dos roedores capturados por sexo.....	64
Figura 3.27 - Observação de um gel de eletroforese de amostras biológicas após amplificação por <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B).....	65
Figura 3.28 - Representação gráfica dos resultados obtidos nas amostras biológicas provenientes dos roedores, que foram processadas pela <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B).....	66
Figura 3.29 - Representação gráfica dos resultados das amostras biológicas (roedores) provenientes dos distritos (Lisboa e Setúbal) processadas pela <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B)...	66
Figura 3.30 - Representação gráfica dos resultados obtidos pela <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais (A e B) nas amostras obtidas nos diferentes órgãos dos roedores.....	67
Figura 3.31 - Observação de um gel de eletroforese de amostras biológicas, após amplificação por <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	67
Figura 3.32 - Representação gráfica dos resultados obtidos nas amostras processadas pela <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	68
Figura 3.33 - Representação gráfica dos resultados do material biológico (roedores) do distrito de Lisboa que foram submetidas ao protocolo de <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	68
Figura 3.34 - Representação gráfica dos resultados do material biológico (roedores) do distrito de	

Setúbal que foram submetidas ao protocolo de *nested*-PCR com *primers* específicos

“LipL32”69

Figura 3.35 - Árvore filogenética, realizada no programa CLC Genomics Workbench 12, baseada
no alinhamento do segmento do gene *lipL32*.....71

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Condições necessárias para a 1ª e 2ª reações do protocolo <i>nested</i> -PCR com os <i>primers</i> universais (A e B).....	40
Quadro 2 - Condições necessárias para a 1ª e 2ª reações do protocolo <i>nested</i> -PCR com os <i>primers</i> específicos “lipL32F e lipL32R”	41
Quadro 3 - Representação do número de amostras recolhidas nos diferentes concelhos dos dois distritos estudados.....	46
Quadro 4 - Resumo dos resultados obtidos nos diferentes <i>nested</i> -PCR para as amostras de água.....	53
Quadro 5 - Distribuição do número de amostras recolhidas nos diferentes concelhos dos dois distritos estudados.....	54
Quadro 6 - Resumo dos resultados obtidos nos diferentes <i>nested</i> -PCR para as amostras de solo.....	61
Quadro 7 - Distribuição do número de espécimes (roedores) capturados nos diferentes concelhos dos dois distritos estudados.....	62
Quadro 8 - Distribuição das amostras biológicas obtidas dos roedores capturados por abordagem laboratorial e órgão/tecido processado.....	65
Quadro 9 - Resumo dos resultados obtidos nos diferentes <i>nested</i> -PCR para as amostras de biológicas.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das genoespécies de <i>Leptospira</i>	3
Tabela 2 - Resultados do teste Qui-Quadrado entre a tipologia da água e a presença ou ausência de <i>Leptospira</i> spp.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac – Anticorpo

Ag – Antigénio

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CDC - *Centre for Diseases Control*

Cm – Centímetros

DDO – Doença de Declaração Obrigatória

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (=ADN - Ácido desoxirribonucleico)

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMJH – Ellinghausen, McCullough & Johnson and Harris

EUA - Estados Unidos da América

Fig. – Figura

g - Grama

h - Hora

HDESPD - Hospital Divino Espírito Santo de Ponta Delgada

IgG – Imunoglobulina do tipo G

IgM – Imunoglobulina do tipo M

IHMT/UNL – Instituto de Higiene e Medicina Tropical / Universidade Nova de Lisboa

Km² - Quilómetro quadrado

LCR – Líquido céfalo-raquidiano

LipL32 – Lipoproteína Lepto32

LLBL - Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme

LPS – Lipopolissacárido

MACROLepto - Teste de Aglutinação Macroscópico

mg - Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetros

NO₂ - Dióxido de Nitrogénio

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Par de Bases

PBS - *phosphate buffered saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (=Reação em cadeia da polimerase)

pH – Potencial de hidrogénio

PLG – Plasminogénio humano

rpm – rotação por minuto

spp. – Espécie

TAM – Teste de Aglutinação Microscópica (teste de referência)

Valor de p – Probabilidade de significância

WHO – World Health Organization

µg – Micrograma

µl – Microlitro

µm – Micrometro

µM – Micromolar

χ²– Qui-quadrado

°C – Grau Celsius

% – Percentagem

I. INTRODUÇÃO

1.1. Leptospiras e leptospirose

1.1.1 - Biologia de *Leptospira* spp.

As leptospiras constituem um grupo de bactérias, designado por espiroquetas ou espiroquetídeos. São bactérias aeróbias obrigatórias e gram (-), com morfologia espiralada e helicoidal, apresentando elevada motilidade. Têm um diâmetro de aproximadamente 0,1µm e um comprimento que pode variar entre 6 a 20µm, com extremidades encurvadas em forma de gancho (Fig. 1.1), e possuem dois flagelos periplasmáticos.

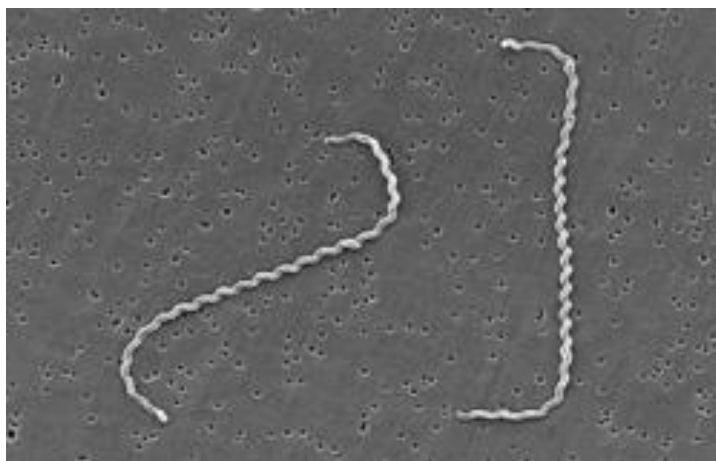


Figura 1.1 - Microfotografia eletrónica de *Leptospira* spp.
(Adaptado de Levett, 2001)

A parede celular é constituída por peptidoglicano, a qual se associa à membrana citoplasmática que é revestida pela bainha externa. Entre a parede celular e a membrana externa situam-se os flagelos, que se estendem de uma extremidade à outra da bactéria (Levett, 2001).

As leptospiras têm um tempo de geração longo e exigem condições de crescimento *in vitro* muito específicas, das quais se destacam a temperatura que deve ser mantida entre 28°C e 30°C e sob agitação permanente. Necessitam ainda de um meio de cultura muito rico em nutrientes, entre os quais vitaminas B2, B12 e ácidos gordos de cadeia longa, estes últimos são mesmo a base energética que o seu crescimento exige. As leptospiras, quando se encontram em ambiente abiótico (solos ou águas superficiais) o pH destes deve ser neutro ou ligeiramente alcalino, o que lhes permite sobreviver por um período prolongado de tempo que pode ir de alguns meses a um ano ou mais (Faine *et al.*, 1999; Andre-Fontaine, G., 2015).

1.1.2 - Taxonomia e Classificação

Os três géneros de espiroquetas com importância médica pertencem à Ordem Spirochaetales, da qual fazem parte duas Famílias: Spirochaetaceae e Leptospiraceae. Da primeira Família fazem parte dois géneros: *Treponema* e *Borrelia*, enquanto que o género *Leptospira* pertence à Família Leptospiraceae (Faine *et al.*, 1999).

Quanto à classificação do Género *Leptospira*, coexistem atualmente dois sistemas: a classificação fenotípica ou convencional (de base antigénica) e a classificação molecular (de base genética). A classificação fenotípica é amplamente utilizada e divide o Género *Leptospira* em duas espécies, uma espécie patogénica, conhecida como *Leptospira interrogans* constituída por mais de 260 serovares agrupados em 25 serogrupos, e uma espécie saprófita designada por *L. biflexa* onde se incluem cerca de 60 serovares, constituindo 38 serogrupos conhecidos, (Levett, 2001). De referir que em ambos os sistemas de classificação, o serovar é o táxon base.

Além das características antigénicas das leptospiros, a classificação fenotípica baseia-se também em critérios de patogenicidade decorrentes dos antígenos (LPS, proteínas) presentes na respetiva membrana externa. Inclusive é com bases nestas características que muitas vezes se recorre a testes fenotípicos para identificar o carácter patogénico ou saprófita de um 'novo' isolado.

Mas, nos últimos anos, os avanços registados nas técnicas moleculares têm sido importantes em diversas áreas do conhecimento e a área da microbiologia não é exceção, tendo permitido uma mais rápida identificação das espécies. Para além dessa particularidade, a biologia molecular veio igualmente revolucionar a forma como o Género *Leptospira* é constituído, tendo assim, surgido a classificação molecular (Picardeau, 2013) que, sem substituir a classificação fenotípica, vem hoje completá-la, trazendo mais e melhor informação, estimulando também o desenvolvimento exponencial de novas ferramentas de diagnóstico de base molecular que estão hoje disponíveis nos laboratórios e, por consequência, ao serviço das populações.

Tabela 1 - Classificação das genoespécies de *Leptospira*. (Adaptado de Thibeaux et al., 2018)

Espécie		
Patogénicas	Intermédiás	Saprófitas
<i>L. interrogans</i>	<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. kirschneri</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. yanagawae</i>
<i>L. noguchii</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. alexanderi</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. vanthielii</i>
<i>L. weilii</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. wolbachii</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. terpstrae</i>
<i>L. mayottensis</i>		
<i>L. santarosai</i>		
<i>L. alstonii</i>		
<i>L. kmetyi</i>		

Assim, com base na classificação molecular, o Género *Leptospira* inclui diversas genoespécies (Tabela 1), as quais são definidas consoante o grau de hibridação DNA-DNA (igual ou superior a 70%). Este sistema de classificação tem atualmente 22 genoespécies identificadas e validadas, sendo que 10 são patogénicas, seis (6) são saprófitas, identificadas em amostras ambientais, e seis (6) intermédiás (Thibeaux et al., 2018). Estas últimas, diferenciam-se das genoespécies patogénicas e saprófitas, por não se conhecer totalmente o grau de virulência associado, apesar de possuírem algumas características comuns com ambos os grupos (Picardeau, 2013).

1.1.3 - *Leptospira* spp. - Ciclo zoonótico

A leptospirose é a zoonose com maior distribuição em todo o mundo, tendo aumentado gradualmente de importância nos últimos anos (ECDC, 2018). Os humanos (hospedeiros acidentais) são infetados aquando de uma exposição direta ou indireta com urina de animais colonizados ou infetados com leptospirosas, bem como através de água ou solos contaminados (Mwachui, 2015). Estas bactérias penetram no organismo dos através de uma escoriação/lesão da pele ou pelas mucosas (nariz, boca e olhos) (Ko et al., 2009). Apesar de menos frequente, as leptospirosas podem também penetrar a pele íntegra, se o indivíduo exposto permanecer por um longo período de tempo dentro de água (por exemplo, trabalhadores de

plantações de arroz) ou em contacto com solo contaminado pelas referidas bactérias. A transmissão das leptospiros é, no entanto, rara entre humanos, bem como durante a gestação ou aleitamento, apesar de existirem alguns casos reportados (Levett, 2001; Adler *et al.*, 2010).

A par dos humanos, existem mais de 160 espécies de mamíferos (domésticos, de produção pecuária e silváticos) capazes de ser infetados ou colonizados por leptospiros, sendo responsáveis pela transmissão da bactéria aos humanos e/ou a outras espécies animais. Contudo, são os roedores os principais responsáveis pela transmissão, sendo mesmo considerados como reservatórios dos referidos agentes patogénicos. Os roedores mantêm uma relação de homeostasia com as leptospiros, as quais permanecem no seu organismo (túbulos renais) sem que lhes causem qualquer dano. Desta forma, os roedores são sempre assintomáticos, eliminando leptospiros através da urina, durante toda a sua vida. Este facto, aliado à sua elevada taxa de proliferação e à capacidade de habitar qualquer local, confere-lhes uma elevada importância no que respeita à transmissão deste agente infeccioso aos humanos e outros mamíferos (Adler, 2015) (Fig. 1.2).

Assim, outras espécies animais (canídeos, bovinos, suínos, equinos entre outras) são igualmente suscetíveis de ser infetadas por leptospiros tal como os humanos, ou por transmissão placentar ou por via genital. Contudo, é o contacto direto, a principal causa de transmissão, já que as leptospiros sendo excretadas pela urina de algumas destas espécies infeta sucessivamente outros mamíferos que contactam com alimentos ou águas contaminadas pelos primeiros (Faine *et al.*, 1999).

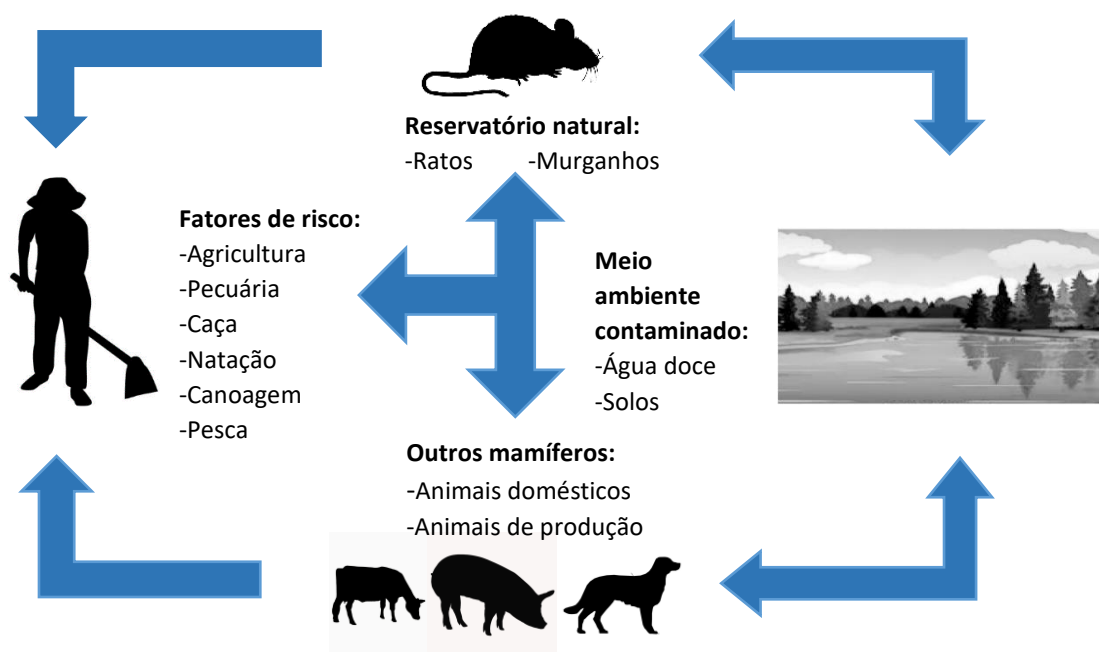


Figura 1.2 - Ciclo zoonótico de transmissão das leptospiros. (Imagem do autor)

Alguns serovares estão mesmo relacionados com algumas espécies de mamíferos, o que demonstra que existe um certo tropismo entre as referidas leptospiros e as diferentes espécies de mamíferos. Exemplo disso são os serovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, que são encontrados com mais frequência em

roedores, respetivamente das espécies *Rattus norvegicus*, *R. rattus* e *Mus musculus*; enquanto o serovar Pomona é mais comum nos suínos, ou o serovar Canicola, que apresenta uma grande afinidade para os cães (Bharti *et al.*, 2003).

1.1.3.1 - Roedores como principais reservatórios

Importa dizer que os roedores e, em particular, os ratos, são mamíferos pertencentes à Ordem Rodentia e à Família Muridae, a qual compreende cerca de 650 espécies, agrupadas em 140 géneros. Como referido, estes mamíferos são considerados como praga, transmissores de agentes patogénicos capazes de causar doenças graves aos humanos, muitas delas epidémicas e causadoras de grandes catástrofes, como relata a História (por exemplo, a epidemia da “peste negra”). Para além dos agentes patogénicos que podem transmitir, são também conhecidos pelos seus hábitos furtivos, os quais estão relacionados com a capacidade de causar grandes prejuízos económicos (Randall, 2001).

As características dos roedores estão particularmente associadas à capacidade de transmissão das leptospiros, tornando-os os principais responsáveis pela distribuição dos agentes causais da leptospirose. Assim, importa realçar algumas destas características, as quais são decisivas para que esta zoonose seja considerada de importância mundial. De facto, a reconhecida capacidade dos roedores se adaptarem às diversas condições ambientais, torna-os capazes de habitar em diferentes locais, muitas vezes de grande proximidade com os humanos (Randall, 2001).

Como anteriormente referido, os roedores têm igualmente um papel relevante na distribuição dos diferentes serovares de *Leptospira* spp., pelas diferentes regiões, uma vez que existe uma afinidade (tropismos) de alguns serovares de *Leptospira* por uma determinada espécie animal (reservatório e/ou hospedeiro). Como exemplo, pode referir-se a elevada prevalência do serovar Icterohaemorrhagiae associada ao Género *Rattus*, e de leptospiros do serovar Ballum, reconhecidamente associada ao ratinho caseiro da espécie *Mus musculus* (Bharti *et al.*, 2003).

Resumindo, pode então dizer-se que as espécies de roedores mais envolvidas na transmissão de *Leptospira* spp., são *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* (Fig. 1.3) e *Mus musculus*. Considerando o âmbito da presente Dissertação, entendeu-se útil fazer uma breve resenha das principais espécies, dada a sua particular e referida associação às diversas espécies de espiroquetas do Género *Leptospira*.



Figura 1.3 - Exemplo de um roedor *Rattus rattus* uma das espécies responsáveis pela disseminação de leptospiros no ambiente.
(fotografia adaptada de Dreamstime)

Assim, a espécie *Rattus norvegicus*, conhecida por ratazana ou rato de esgoto apresenta características morfológicas distintas que a diferenciam das restantes espécies. Trata-se de uma espécie que surgiu no continente asiático, tendo-se espalhado pelo mundo, muito devido ao comportamento humano. Esta espécie de roedor tem cerca de 25cm de comprimento, cauda curta, orelhas pequenas e membranas interdigitais. O peso médio de um adulto pode variar entre 275 e 575g e a coloração da pelagem entre o castanho escuro, cinzento e/ou preto, sendo mais intensa na região ventral (Randall, 2001; Bharti *et al.*, 2003). Os animais desta espécie vivem em grupo e preferem habitar em zonas baixas (solos), embora também sejam bons trepadores. Em comum com os restantes roedores, têm o facto de serem animais noturnos, com uma atividade diurna apenas em caso de ausência de ameaça. A reprodução ocorre nas estações quentes (verão e outono), com cerca de cinco ninhadas por ano, cada uma com cinco a oito crias (Randall, 2001).

A espécie *Rattus rattus* também é originária do continente asiático, tendo igualmente chegado a todas as partes do mundo. Estes roedores habitam naturalmente em regiões florestadas, contudo, a proximidade aos humanos é comum nos dias de hoje, sendo normal avistá-los em zonas rurais ou urbanas. Em comparação com as ratazanas da espécie *R. norvegicus*, estes ratos apresentam uma cauda maior, orelhas grandes e sem pelo. Quanto ao comprimento destes animais, o adulto tem cerca de 32,4 a 46,4 cm, com uma cauda de cerca de 17 a 25cm de comprimento, e um peso médio de 110 a 340g, como ilustrado na figura 1.4. São animais noturnos, apesar de estarem bem-adaptados à proximidade com humanos podendo mesmo ser muito ativos em zonas urbanas e na ausência de predadores (Randall, 2001; Bharti *et al.*, 2003).

Ao contrário da espécie *R. norvegicus*, os roedores da espécie *R. rattus* são excelentes trepadores e nadadores, sendo por isso habitual que estes animais sejam avistados em zonas altas, como árvores ou telhados de casas. Formam grupos com uma hierarquia própria, onde coabitam animais da mesma família,

com vários machos e habitualmente duas fêmeas dominantes, além de todos os elementos possuírem um odor semelhante. Quanto à sua reprodução, esta acontece geralmente entres meses de março e novembro, contudo são capazes de produzir ninhadas durante todo o ano, se tiverem um ambiente estável. Habitualmente têm três a cinco ninhadas, cada uma variando entre uma e 16 crias (Randall, 2001; Bharti *et al.*, 2003).

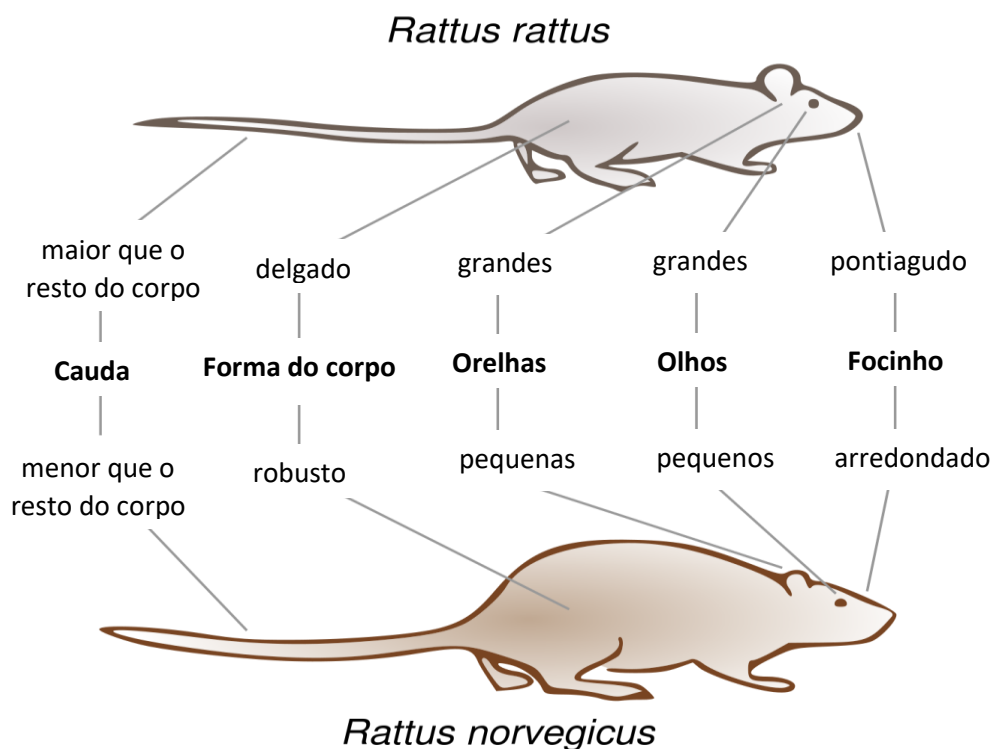


Figura 1.4 - Comparação das principais características morfológicas das espécies *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*. (Adaptado de Wikiwand)

Por sua vez, a espécie *Mus musculus* é também conhecida por rato caseiro, é, entre as três espécies de roedores, uma das mais associadas à transmissão de leptospiros, sendo que é também a que tem a maior distribuição mundial. Os representantes desta espécie são reconhecidos como roedores de pequeno porte (pesam entre 12 a 30 gramas), medindo entre 6,5 a 9,5cm de comprimento, não incluindo a longa cauda, que mede entre 6 a 10cm.

Outras características que os distinguem são a proeminência dos olhos, as orelhas grandes e o focinho pontiado com bigodes longos. De forma semelhante às espécies anteriores, membros da espécie *Mus musculus* têm uma atividade noturna, estando em alguns casos dependentes dos humanos no que respeita à alimentação e abrigo, apesar de também existirem espécimes que habitam longe dos centros urbanos. Estes animais subsistem em grupos familiares grandes, onde os machos são dominantes, acasalando com mais do que uma fêmea. Estas produzem normalmente seis a oito ninhadas em cada ano, originando cerca de 50 novas crias todos os anos (Randall, 2001).

1.1.3.2 – A importância do ambiente

Quando as leptospirosas são libertadas no ambiente, elas são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo (semanas ou meses), caso encontrem condições favoráveis, como temperatura amena, solo húmido e coleções de água doce (lagos, lagoas, rios, barragens, entre outros) com um pH neutro ou ligeiramente alcalino (Adler *et al.*, 2015), como já referido.

A maior parte dos casos de leptospirose ocorre assim, nos meses com pluviosidade aumentada. No caso dos países com clima temperado, os meses de verão e outono são os que registam uma maior incidência da doença, enquanto que nos países de clima tropical, a estação das chuvas é a mais crítica no que respeita à transmissão de leptospirosas. Os solos húmidos e as coleções de água doce representam, desta forma, uma fonte de transmissão importante em todo o mundo (Fauci *et al.*, 2008).

Estão relatados vários casos de surtos de leptospirose originados, especialmente, pelo contacto com águas contaminadas, a maioria após a ocorrência de eventos desportivos, envolvendo a permanência dos atletas em lagos ou rios. Alguns exemplos destas atividades aquáticas são a canoagem, *windsurf*, ou natação, onde, ao longo da História se conheceram os casos mais graves de surtos desta doença. Há cerca de duas décadas (1998), após a descarga de produtos de agricultura dos terrenos circundantes a um lago onde decorreu a prova de triatlo de Illinois (EUA) foi registado um surto da doença, o qual causou, na altura, cerca de 80 mortos (Morgan *et al.*, 2002).

Mas, outros relatos de surtos associados a desastres ambientais têm sido constantes ao longo do tempo. Desde 1995, altura em que se registou uma epidemia na Nicarágua, vários foram os casos relatados ao longo dos anos, relacionados com inundações e catástrofes naturais, incluindo sismos. Estes factos vêm reforçar a importância que a água tem na transmissão das leptospirosas aos humanos, mas também o papel, cada vez mais reconhecido, dos solos como fonte de contaminação. Em situação de catástrofe natural, e na ocorrência de cheias, a passagem da água pelos solos contaminados irá torná-la um veículo muito propício à transmissão. As regiões com clima tropical são as mais afetadas pelos desastres naturais acima descritos, os quais aliados à deficiente estrutura sanitária e à escassez de recursos, tornam as populações vulneráveis à exposição e consequente infeção (Schneider *et al.*, 2013).

1.1.3.3 - Transmissão aos humanos

Como se depreende do ponto anterior, a prevalência da doença é maior em países tropicais e subtropicais, representando um risco sério para a saúde da maioria da população, especialmente entre os que têm menos recursos, em particular, os que estão sujeitos a saneamento básico deficitário. Contudo, devido ao clima tropical, com chuvas constantes e temperaturas quase sempre elevadas, a ocorrência de leptospirose na população é praticamente transversal a toda a população, dos mais ricos aos mais pobres,

aumentando a probabilidade de contacto com água ou solos contaminados, os quais favorecem o aparecimento de surtos epidémicos (Levett, 2001).

Em contraste com os países de clima tropical e subtropical, nos países com clima temperado as taxas de incidência estão especialmente associadas aos grupos profissionais de risco. Nestes casos a transmissão pode ser feita de forma direta ou indireta, dependendo do grupo profissional em causa e do tipo de atividades que realizam. Assim, alguns exemplos são os trabalhadores do saneamento básico, pescadores e agricultores, que trabalham diretamente com água (doce ou residual), solos ou lixo, passíveis de estarem contaminados. Por outro lado, os trabalhadores de matadouros e veterinários estão expostos diretamente a tecidos e fluidos de animais que podem estar infetados, aumentando o risco de transmissão (Levett, 2001; Pappas *et al.*, 2008).

Os animais têm assim, um papel preponderante na transmissão das leptospiros aos humanos, como abordado anteriormente. Nos países tropicais e subtropicais esta realidade é mais evidente no caso dos animais utilizados na agropecuária. Estes estão em maior proximidade com os humanos, que têm neles a sua fonte de rendimento, fazendo com que não só o risco de transmissão da bactéria (*Leptospira* spp.) aumente, como também os prejuízos económicos sejam superiores, associados à diminuição da produção de leite e/ou carne (Acha & Szyfres, 2003; Schneider *et al.*, 2013).

No caso dos países desenvolvidos, a realidade pode ser diferente, com os animais domésticos (por exemplo, cães e atualmente também os gatos), dada a mudança de hábitos que faz deles hoje, animais muito sedentários, quer em alimentação quer em atividade física, representando um risco acrescido para a saúde dos humanos, os quais estão diariamente em contacto com eles. A proximidade dos roedores às zonas urbanas ou rurais, torna também possível a infeção das referidas espécies (Ayanegui-Alcerreca *et al.*, 2007; Maele *et al.*, 2008; Lilenbaum *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2013).

1.2 - Epidemiologia/Distribuição

1.2.1 - A leptospirose no Mundo

A distribuição mundial da leptospirose afeta atualmente mais de um milhão de pessoas com cerca de 60 000 mortes por ano (Costa *et al.*, 2015). No entanto, a distribuição é variável e depende de vários fatores associados ao país ou região do Globo considerada (clima, presença de roedores, características sociais e económicas, entre outras). A incidência da doença é mais elevada em países tropicais, os quais reúnem as características ótimas para a transmissão do agente.

Um pouco por todo o mundo, a leptospirose é considerada de difícil diagnóstico, devido à inespecificidade do quadro clínico, o qual pode ser confundido com várias outras doenças infecciosas causadas

por diferentes agentes etiológicos. Esta realidade é intensificada em países de baixos recursos, ou de clima tropical, os quais geralmente não dispõem de um laboratório adequado e de recursos humanos qualificados para diagnosticar e identificar corretamente a doença. Desta forma, sabe-se que a distribuição da leptospirose se encontra subnotificada um pouco por todo o mundo, mas com uma maior relevância nos países de baixa renda (Gonçalves, 2009; Salwani *et al.*, 2014).

O problema da subnotificação da doença, quer pela dificuldade no diagnóstico clínico, quer pela falta de consciencialização da população e até pela ausência, em muitas regiões do Globo, dos referidos meios de diagnóstico laboratorial que apoiem os Clínicos, leva a que a real prevalência de leptospirose no mundo não seja conhecida. Contudo, estima-se que a incidência se situe em 0,1 de casos por 100 000 habitantes/ano (ECDC, 2018). Esta discrepância está relacionada com os casos de surtos epidémicos que ocorrem regularmente nos trópicos, os quais são responsáveis pela elevada incidência da leptospirose nestas regiões, quando comparada com os países de clima temperado. Em 2015 foram reportados na Europa cerca de 1 222 casos de leptospirose, dos quais 626 foram confirmados (ECDC, 2018).

Analisando-se a história recente da leptospirose e de que forma se tornou um importante problema de saúde à escala global, percebe-se que os dados relativos à prevalência da doença nem sempre foram claros e credíveis, acreditando-se que o problema da subnotificação sempre esteve patente, especialmente nas regiões de baixa renda. Há duas décadas, por exemplo, foram notificados cerca de 500.000 casos na China, ao mesmo tempo que o Brasil registava 28.000 novos casos de leptospirose. Todos os anos, os EUA reportam 40 a 120 novos casos da doença, contudo, segundo estimativas do CDC (*Centre for Diseases Control*) estes dados estão aquém da real dimensão do problema, pelo que autores como Costa e colaboradores em 2015, apontaram para uma ocorrência anual de, pelo menos, um milhão de pessoas infetadas em todo o mundo, o que, naturalmente não resolve a evidência da subnotificação associada à infeção por *Leptospira* spp. (Fauci *et al.*, 2008; WHO, 2010; Schneider *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2015).

Quanto à distribuição da leptospirose nos diversos continentes, sabe-se que o continente africano é o que tem uma percentagem mais baixa de casos reportados quando comparado com os restantes, apenas 1%, facto sugestivo, uma vez mais, de uma dificuldade em proceder ao diagnóstico, ou até mesmo de identificar a doença. Nas restantes regiões do mundo, existem dados referentes ao Oeste do Pacífico, com 15% dos casos reportados a nível mundial, seguido pelo Sudeste da Ásia (14%) e Europa (8%). Quanto ao continente americano, sabe-se que no período compreendido entre 2007 e 2013, 67% dos casos reportados a nível mundial são provenientes do referido continente, sendo os países mais afetados o Brasil, Nicarágua e Argentina (Schneider *et al.*, 2013).

Contudo, e apesar da existente subnotificação e da leptospirose ser considerada uma doença negligenciada um pouco por todo o mundo, a doença faz parte das 10 infeções mais reportadas à OMS, demonstrando a sua importância mundial (Schneider *et al.*, 2013).

1.2.2 - A leptospirose em Portugal

Leptospiras da espécie *L. interrogans* foram pela primeira vez isoladas em Portugal em 1931 por Luís Figueira (citado por Vieira, 2006). Seguiram-se depois duas décadas de investigação (anos 40 a 60 do século passado), levadas a cabo pelo Professor Fraga de Azevedo, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), o que foi, à época, um marco na investigação da leptospirose no país, sobretudo ao nível epidemiológico, com a realização de diversos inquéritos quer sobre roedores quer em outras espécies animais.

Mas foi na década de 80 que começaram os estudos mais aprofundados acerca da bactéria, quando a Investigadora Margarida Collares-Pereira, também no IHMT, realizou vários inquéritos epidemiológicos, também na população humana, identificando a origem da maioria dos casos de leptospirose em Portugal (sobretudo, na zona centro do país) e ilhas, especialmente do Arquipélago dos Açores. Importa referir que logo em 1950 a leptospirose foi considerada em Portugal, como Doença de Declaração Obrigatória (DDO). Inicialmente, a notificação era obrigatória apenas para *L. icterohaemorrhagiae*, tendo em 1987, passado a incluir-se na referida notificação todas as estirpes infetantes (Vieira, 2006), situação que se mantém até ao presente.

Mais tarde, foi realizado em Portugal (Vieira *et al.*, 2006) um estudo retrospectivo cobrindo o período entre 1986-2003 (18 anos) que incluiu também o Arquipélago dos Açores, de forma a tentar entender melhor a dinâmica da doença no país.

Na região insular dos Açores, sobretudo nas ilhas de São Miguel e Terceira) a taxa de incidência da doença ao longo dos últimos anos tem sido elevada (11,1 casos por 100 000 habitantes/ano) quando comparada com o número de casos reportados em Portugal continental. Os números reportados referentes aos Açores, mostraram assim uma incidência que se traduzia em cerca de 10 vezes mais casos anuais por 100 000 habitantes, comparativamente aos dados continentais, realidade descrita em 2006 por Vieira e colaboradores. Estes números eram, à época, acompanhados por uma taxa de mortalidade igualmente preocupante para a região.

De facto, desde 1993, o Arquipélago dos Açores, tem sido considerado como área endémica de leptospirose em Portugal, com uma incidência anual semelhante a outras regiões tropicais, tal como o Taiti (11,3 casos por 100 000/ano). A elevada incidência de leptospirose nesta região de Portugal pode ser explicada pelo clima semi-tropical e também pelo ambiente rural que se encontra um pouco por todo o Arquipélago, mesmo em zonas consideradas urbanas. Estes factos são fundamentais para aumentar o risco de exposição a que a população está sujeita, situação que está diretamente relacionada com a utilização de solos para agricultura e às explorações especialmente de gado bovino para a obtenção de leite, entre outros produtos de agro-pecuária. No contexto rural em que vive a maioria da população, é comum que os

habitantes mantenham perto das suas casas uma horta ou animais, mesmo para consumo próprio. O manuseamento dos solos e a manutenção diária dos referidos animais aumentam o risco de exposição da população às leptospirosas, as quais são libertadas pela urina dos roedores que circundam as imediações quer dos terrenos quer das habitações (Witmer *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2010).

Há uma década e meia atrás (2004), estimava-se que, de entre os animais utilizados para produção de leite e derivados, 30-40% estavam infetados com leptospirosas, o que constituía um problema grave de saúde pública, uma vez que se falava de cerca de 200 000 animais, numa média de 20-30 animais por cada família Açoriana (Witmer *et al.*, 2004).

Também se sabe que a transmissão de leptospirosas ocorre sazonalmente o que nos Açores, é ainda mais potenciado, devido ao facto de se registarem índices de pluviosidade e de humidade atmosférica muito acentuados não só nos meses de outono e inverno, como durante praticamente todo o ano. Acresce que o clima e relevo das ilhas favorecem a transmissão, uma vez que a água da chuva desce as encostas onde arrasta leptospirosas que podem estar nos solos e/ou em coleções de água (Witmer *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2006).

Diversos estudos desenvolvidos desde os anos 90 no IHMT, pela investigadora Margarida Collares-Pereira e colaboradores, permitiram saber que no arquipélago dos Açores os roedores são os principais responsáveis pela manutenção da bactéria naquela Região. Um outro estudo, mais recente no âmbito do Projeto “Epidemiologia e Controlo da leptospirose na Região Autónoma dos Açores”, que incluiu as ilhas de São Miguel e Terceira, entre 2003-2008, igualmente liderado pela referida investigadora e uma equipa pluridisciplinar permitiu, entre outros *outputs*, isolar o agente da leptospirose em 53% dos roedores capturados, só na ilha de São Miguel (Collares-Pereira *et al.*, 2008). No âmbito da população humana, o mesmo estudo revelou, através dos estudos serológicos em amostras séricas obtidas em doentes assistidos no Hospital Divino Espírito Santo de Ponta Delgada (HDESPD) da referida ilha, que os serogrupos Icterohaemorrhagiae e Ballum, foram maioritariamente os mais prevalentes, resultado sobreponível com o que anteriormente se conhecera através de isolados de *Leptospira* obtidos de roedores da referida Região insular (Witmer *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2006).

No que respeita, à situação de Portugal continental, as taxas de incidência da doença têm-se felizmente mantido baixas da ordem dos 0,7 a 0,3 /100 000 habitantes (Vieira *et al.*, 2007; Carreira *et al.*, 2019), com o registo de um ou outro surto epidémico. De qualquer modo, não é igualmente de excluir muitos outros casos de leptospirose que não chegam a ser diagnosticados laboratorialmente, por um lado devido à inespecificidade da sintomatologia que lhe está associada e por outro, à falta de um enquadramento epidemiológico robusto, pelo que acaba não sendo diagnosticada e, por consequência não é também notificada enquanto DDO.

1.3 - Patogénese

1.3.1 - Infecção e Resposta imune

Os fatores de virulência, tais como a produção de toxinas pelas estirpes patogénicas, ou as proteínas de superfície são decisivos no decorrer da infeção, sendo estes últimos, responsáveis pela determinação do serovar, ou pela forma como a infeção irá progredir. Assim, os fatores de virulência da bactéria têm uma relação importante na forma como as diferentes estirpes patogénicas vão atuar no organismo dos humanos, causando diferentes quadros clínicos (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003).

As leptospiros, após penetrarem no organismo do hospedeiro vão entrar na corrente sanguínea, local onde irão multiplicar-se rapidamente, numa fase comumente chamada de leptospirémia. Esta fase dura entre 1 a 7 dias e está associada ao aparecimento dos primeiros sinais e sintomas (febre, cefaleias e mialgias), os quais são inespecíficos e facilmente confundidos com uma síndrome gripal ou com outra doença infecciosa, que não a leptospirose (Faine *et al.*, 1999; Bharti *et al.*, 2003; Adler *et al.*, 2010).

Após esta primeira fase de multiplicação na corrente sanguínea, o hospedeiro inicia uma resposta imunológica, que atua na remoção da bactéria da circulação, tecidos e órgãos infetados. O sistema imunitário utiliza mecanismos de fagocitose, opsonização e produção de anticorpos circulantes da classe IgM para garantir a recrudescência da infeção. Estes mecanismos estão associados à fase imune da infeção e surgem numa altura em que a bactéria começa a ser libertada pela urina do hospedeiro (leptospirúria) (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Apesar dos mecanismos imunológicos descritos no parágrafo anterior, estes não são suficientes para travar o progresso da infeção, pelo que as leptospiros entram nos tecidos e órgãos, multiplicando-se rapidamente num período de tempo que pode chegar a 30 dias. Ao fim deste período de incubação, surgem novos sinais e sintomas, os quais estão ligados à localização das leptospiros no organismo do hospedeiro. Apesar deste facto, as complicações associadas a uma infeção por *Leptospira* spp., surgem habitualmente ao final da segunda semana após a bactéria ter penetrado o organismo do hospedeiro (Levett, 2001; Vieira, 2006).

Assim, é amplamente reconhecido que desde a fase inicial, as leptospiros são capazes de escapar à resposta imunitária, desconhecendo-se totalmente os mecanismos que estão por detrás deste facto. No entanto, sabe-se que a bactéria demonstra alguma resistência à via alternativa do complemento, especialmente ao fator H, o qual é responsável pela regulação do complemento (Farrar *et al.*, 2014).

Através dos mecanismos descritos nos parágrafos anteriores, as leptospiros patogénicas desenvolvem os processos inflamatórios, os quais são responsáveis pelos danos teciduais causados nos órgãos do hospedeiro, especialmente ao nível hepatorenal (Marinho & Cardoso, 2014).

1.3.2 - Leptospirose anictérica

A leptospirose tem um período de incubação médio de 5 a 14 dias, no entanto este pode estender-se até aos 30 dias. A doença pode manifestar-se de diversas formas, sendo que a mais comum é a assintomática, no entanto, pode variar entre um quadro semelhante a uma síndrome gripal ou, na sua forma mais grave, ser fatal para o hospedeiro (Levett, 2001; Farrar *et al.*, 2014).

Entre os casos sintomáticos de leptospirose, a forma anictérica é a mais comum, registada em mais de 90% dos doentes, e é considerada como a forma leve da doença (Fauci *et al.*, 2008). A maioria destes casos tem uma sintomatologia inespecífica, a qual é idêntica a um quadro de infeção aguda indiferenciada, com os seguintes sintomas: febre, calafrios, cefaleias, mialgias, náuseas e vômitos. Para além da sintomatologia inespecífica, pode ocorrer também comprometimento pulmonar, acompanhado de tosse e dor torácica (Kelley, 1998; Fauci *et al.*, 2008; Sunil *et al.*, 2016) (Fig. 1.5).

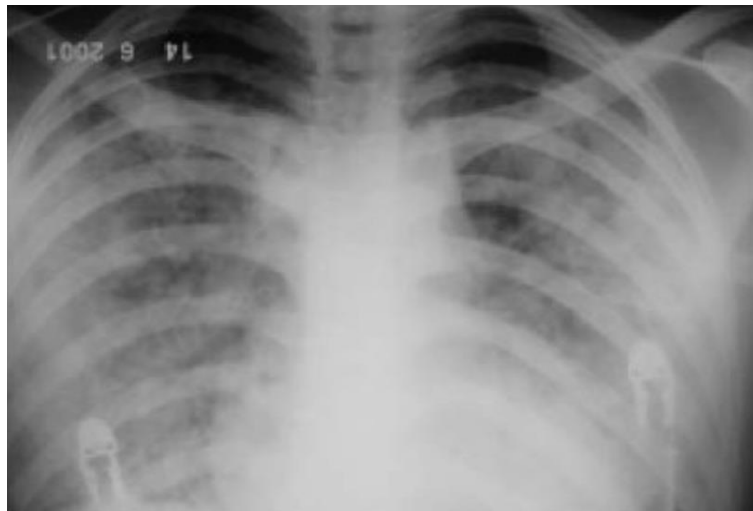


Figura 1.5 - Radiografia ao tórax evidenciando pneumonia por leptospirose.

(Adaptado de Hüttner, 2002)

A fase aguda dura cerca de uma semana e é precedida por um período assintomático, na maior parte dos casos. A fase imune inicia-se após 1-3 dias em alguns casos e a sintomatologia é distinta da fase anterior, com febre e mialgias menos intensas e, em algumas situações, meningite asséptica (Sunil *et al.*, 2016).

A taxa de mortalidade associada à leptospirose anictérica é geralmente muito baixa, a nível mundial. Contudo, em contexto epidémico poderá ocorrer um maior número de mortes, dependendo da sintomatologia associada e da região em causa (Wang *et al.*, 1965; Fauci *et al.*, 2008).

Em países endémicos para leptospirose, a maior parte dos casos são assintomáticos ou manifestam-se na forma anictérica, contudo as diferenças que se observam na clínica da doença estão dependentes do serovar infetante envolvido, o qual pode variar de região para região, consoante a distribuição das estirpes infetantes num determinado local, bem como as espécies de mamíferos presentes (Levett, 2001; Hartskeerl *et al.*, 2011).

1.3.3 - Síndrome de Weil (leptospirose ictérica)

A síndrome de Weil ou leptospirose ictérica é a forma mais grave da infeção por leptospiros e caracteriza-se por um conjunto de sinais e sintomas típicos, tais como: icterícia, disfunção renal, hemorragias e comprometimento pulmonar. Para além destes, o doente pode desenvolver falência multiorgânica, a qual está na origem do surgimento de coagulação intravascular disseminada, miocardite, insuficiência renal e choque (Bharti *et al.*, 2003).

A taxa de mortalidade associada aos doentes com síndrome de Weil é significativamente mais alta (variando entre 5-15%), quando comparada com os doentes com a forma anictérica (Levett, 2001). Na Europa, os casos de síndrome de Weil estão maioritariamente associados aos serovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, com sintomatologia inicial que se assemelha à forma leve, mas que começa a variar ao final dos primeiros 4-9 dias. Após esta fase inicial ligeira, o doente começa a manifestar sintomatologia típica da forma grave: icterícia, disfunção renal e vascular (Levett, 2001; Fauci *et al.*, 2008).

Nos casos mais severos, observa-se um envolvimento multissistémico, o qual provoca em 60% dos doentes um comprometimento multiorgânico, que afeta especialmente o fígado, rins, pulmões, coração, sistema vascular, olhos e sistema neurológico). Para além destas complicações, o surgimento de hipotensão e hemorragia generalizada são manifestações comuns e que estão tipicamente associadas à síndrome de Weil (Levett, 2001; Farrar *et al.*, 2014). Dentro destas ocorrências, a hemorragia pulmonar é indicativa de mau prognóstico para o doente (Vinetz, 2001).

1.4 - Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial, como forma de se identificar e confirmar uma suspeita de leptospirose humana é um procedimento essencial e indispensável, devido à inespecificidade dos sintomas e às diferentes apresentações da doença (Vieira, 2006).

Desta forma, para se proceder ao diagnóstico laboratorial de leptospirose, utiliza-se, em centros diferenciados, como acontece no IHMT, uma combinação de métodos diretos e indiretos. Dentro dos métodos diretos, é de referir a utilização de testes de biologia molecular, com protocolos de PCR [Reação em

cadeia da polimerase] convencional e *nested*-PCR, podendo ainda recorrer-se, em determinadas circunstâncias a PCR em tempo real.

Estes métodos têm demonstrado ser importantes na rotina laboratorial para a deteção de DNA leptospírico, no entanto, só deverão ser usados nos primeiros dias de infeção. Contudo, para além da biologia molecular, outros métodos diretos igualmente disponíveis passam pela microscopia ótica em fundo escuro além da cultura para isolamento do agente, o método *gold standard* em bacteriologia, que consiste em cultivar o agente patogénico em meio de cultura seletivo. Esta metodologia tem, no entanto, algumas limitações decorrentes da exigência, por um lado, de pessoal muito treinado para o efeito e, por outro, do tempo necessário à obtenção de resultados, uma vez que as leptospiros têm um crescimento lento e algo fastidioso (Levett, 2001; WHO, 2003) o que o torna pouco usado na rotina do laboratório, apesar de continuar a ser uma mais-valia para estudos epidemiológicos (ex. cultura de tecido renal de roedores) e em material *post-mortem* (humano).

Já no âmbito dos métodos indiretos, estes são os de maior utilização na prática laboratorial do diagnóstico da leptospirose, através dos quais se pretende detetar anticorpos específicos anti-*Leptospira* spp. Assim, como testes de rastreio (*screening*) são utilizadas diversas abordagens, uma das quais é o teste Aglutinação Macroscópica sobre lâmina (MACROLepto), entre outras, e o teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent-Assay*), sendo que o teste preconizado, ainda hoje, pela OMS sendo mesmo o teste de referência imunológico continua a ser o Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) (Levett, 2001; WHO, 2003).

No entanto, apesar de existirem diversos testes de diagnóstico para a leptospirose, a seleção do teste mais indicado depende de vários fatores, entre os quais, a fase de evolução da doença, ou até mesmo a região geográfica onde os mesmos podem estar disponíveis, ou não, bem como os recursos humanos e de equipamento disponíveis. No que diz respeito à fase de evolução da doença, a seleção do método (direto ou indireto) mais adequado é crucial para se obter um diagnóstico correto, uma vez que no decorrer da infeção por *Leptospira*, são diversos os mecanismos imunológicos e celulares envolvidos. Como já referido, na primeira semana da doença, a bactéria encontra-se ainda na corrente sanguínea (fase leptospirémica), o que torna essencial a realização da pesquisa das bactérias no sangue, através de métodos diretos (microscopia de fundo escuro, cultura e/ou abordagens moleculares). Assim, a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp., não é útil na primeira fase da infeção. Ao invés, a utilização de métodos indiretos para o diagnóstico torna-se essencial a partir da segunda semana da doença, altura em que se inicia a resposta imune do hospedeiro com produção de anticorpos específicos, os quais são libertados na corrente sanguínea, sendo suscetíveis de deteção em amostras serológicas (Levett; 2001; WHO 2003; Picardeau, 2013).

Depois de iniciada a resposta imune do hospedeiro, e com o conseqüente aparecimento dos anticorpos no sangue, as bactérias em circulação tendem a desaparecer, tornando inviável o diagnóstico através de métodos diretos, a partir da segunda semana de infeção. Ao mesmo tempo que as bactérias saem da circulação, elas vão alojar-se nos rins do hospedeiro. Desta forma, a deteção de bactérias na urina é

possível a partir da segunda semana da doença, altura em que estas começam a ser libertadas por esta via. A leptospirose dura cerca de um mês no hospedeiro humano (Levett; 2001; WHO 2003; Picardeau, 2013).

Além da importância do diagnóstico laboratorial, importa referir a necessidade do diagnóstico diferencial em doentes que apresentem um conjunto de sintomas inespecíficos (síndrome febril agudo, mialgias, náuseas, vômitos e cefaleias), com história anterior de contacto com água, solos e/ou animais (em ambiente recreacional ou ocupacional). A suspeita de leptospirose também aumenta em contexto epidémico, quando o número de novos casos aumenta exponencialmente numa determinada região (Dutta & Christopher, 2005; Farrar *et al.*, 2014).

No entanto, especialmente em países de clima tropical, a possibilidade de não se tratar de infeção por *Leptospira* é maior, do que em países de clima temperado. De facto, em contexto tropical, doenças como a malária e a dengue que são igualmente endémicas, e numa primeira fase da infeção, registam uma sintomatologia em tudo semelhante com a que verificamos na forma leve da leptospirose, o que ocasiona por vezes problemas de diagnóstico diferencial. Esta situação dificulta o referido diagnóstico nestes países, que habitualmente têm também deficientes recursos laboratoriais (Vinetz, 2001; Dutta & Christopher, 2005).

Nos países de clima temperado, a síndrome febril aguda pode ser confundida com o vírus *Influenza* ou com uma infeção motivada por um vírus entérico. Nas formas mais graves de leptospirose, o diagnóstico diferencial está, muitas vezes, relacionado com uma meningite asséptica ou sépsis. Os Hantavírus são outro exemplo de uma infeção que apresenta características comuns com a leptospirose, a começar na forma de transmissão, através do contacto com roedores, mas também pela sintomatologia, a qual está associada a febres hemorrágicas e comprometimento renal (Farrar *et al.*, 2014).

Referidos que foram de modo genérico as diferentes metodologias utilizadas no diagnóstico laboratorial, entendeu-se ser útil no âmbito da presente revisão da literatura, detalhar um pouco mais, cada uma das referidas abordagens.

1.4.1 - Métodos diretos

1.4.1.1 – Microscopia em fundo escuro

As leptospirosas podem ser identificadas, como referido, através de diversas técnicas de microscopia, tais como, a microscopia de fluorescência e de fundo escuro (abordagem convencional) mas obrigatória, para espiroquetas, sendo que a identificação das leptospirosas está associada às características físicas e morfológicas (dimensões e motilidade) próprias destas bactérias, características que as distinguem e facilitam a sua identificação no exame direto (Collares-Pereira, 1994; WHO 2003; Vieira, 2006).

Contudo, apesar de ser utilizada no laboratório para o diagnóstico de leptospirose, esta técnica tem algumas limitações. A primeira das quais é a necessidade de pessoal técnico qualificado e experiente para

proceder à observação do material biológico ao microscópio, para que a interpretação seja correta. Além disso, importa referir a possibilidade da amostra poder conter vários artefactos, os quais poderão contribuir para a difícil interpretação e, consequentemente inviabilizar o diagnóstico. Por último, a microscopia, apesar de útil na identificação do microorganismo, tornando inequívoco o diagnóstico, apresenta uma sensibilidade e especificidade baixas, exigindo a presença de bactérias intactas e viáveis (com motilidade). Importa ainda referir que a microscopia também é útil numa infeção recente, quando as bactérias ainda estão em circulação na corrente sanguínea do hospedeiro (Collares-Pereira, 1994; WHO 2003; Vieira, 2006).

1.4.1.2 - Exame cultural em meio seletivo EMJH

O exame cultural é, como referido, o único método que permite o isolamento das leptospiros, para posterior identificação das espécies envolvidas na infeção. Desta forma, a cultura é útil no estabelecimento do diagnóstico de leptospirose, auxiliando ainda no entendimento epidemiológico, uma vez que permite detetar serovares patogénicos específicos de uma determinada região, além das manifestações clínicas associadas à bactéria isolada, e ainda possíveis fontes de contágio ou até se os meios de controlo estão a ser eficazes (WHO, 2003).

Apesar da utilidade para estudos epidemiológicos, especialmente em roedores, o exame cultural apresenta algumas limitações, sendo que a principal tem a ver com o tempo de crescimento das leptospiros no meio de cultura, impossibilitando uma resposta rápida. Este facto vai, consequentemente, impedir que o diagnóstico seja dado com rapidez, o que apresenta geralmente uma grande desvantagem, especialmente se estivermos perante um quadro grave da doença (Levett, 2001).

Outras desvantagens deste método estão relacionadas com a interferência de antibióticos, ou da utilização das condições ótimas de crescimento das leptospiros logo após o cultivo. Este último aspeto pode ser especialmente difícil de cumprir nos países com baixos recursos (Levett, 2001).

Pelas razões expostas, a utilização do exame cultural é indicada apenas para o início da infeção, quando a bactéria está em circulação no organismo, sendo que aquele pode ser feito a partir de amostras de sangue ou LCR (Líquido Céfalorraquidiano). Na fase imune (leptospiúria) é também recomendada a utilização de amostras de urina, o que pode potenciar a obtenção de isolamento de *Leptospira* spp. (Farrar *et al.*, 2014)

O meio de cultura comumente utilizado para o isolamento de leptospiros é o meio semissólido EMJH (*Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris*) (Fig. 1.6). As leptospiros são incubadas em aerobiose, a uma temperatura entre 28-30°C, devendo o seu crescimento ser observado semanalmente, utilizando-se a microscopia de fundo escuro para monitorizar o referido crescimento. Quando a cultura é bem-sucedida

observa-se na parte superior do tubo uma zona com opacidade, que corresponde à concentração de leptospiras a qual é designada por anel de Dinger (Levett, 2001; Wuthiekanun *et al.*, 2007; Farrar *et al.*, 2014).

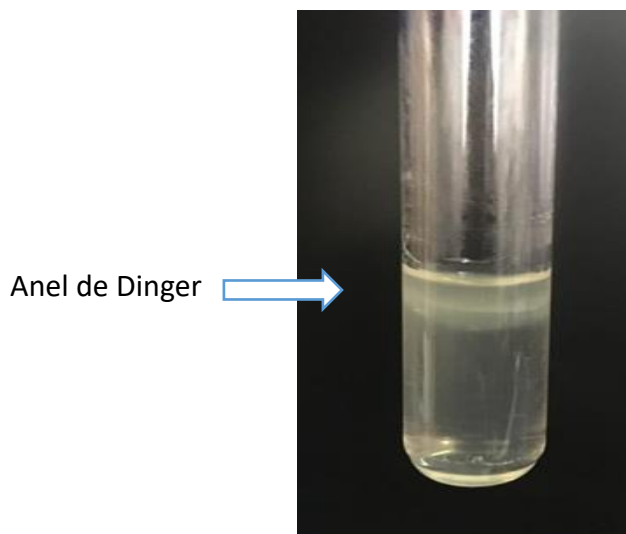


Figura 1.6 - Representação de crescimento bacteriano (*Leptospira* spp.) em meio de cultura (EMJH semi-sólido). Pode observar-se na parte superior do tubo de cultura a presença do anel de Dinger. (Fotografia do autor)

1.4.1.3 - Amplificação de DNA (PCR)

Os métodos moleculares têm adquirido, nos últimos anos, uma importância crescente no diagnóstico da leptospirose. A técnica PCR é utilizada com o objetivo de amplificar o DNA leptospírico presente nas diversas amostras biológicas que chegam ao laboratório, entre as quais, sangue, soro, urina, LCR, ou até mesmo tecidos sólidos como (rim, fígado, pulmão) (Levett, 2001; Vieira, 2006).

As vantagens associadas a esta metodologia são várias, começando na capacidade de detetar DNA de leptospiras em circulação numa fase precoce da infeção, mesmo quando estas estão ainda em escasso número na corrente sanguínea, e em casos em que a resposta imune do hospedeiro ainda não teve início ou este se encontra imunodeprimido (Vieira, 2006).

Os métodos moleculares são igualmente importantes pela capacidade de fornecer um diagnóstico rápido, o qual é especialmente importante nos casos graves da doença, podendo ser fatais para o doente. Desta forma, a rápida identificação do agente causal da infeção vai permitir a administração da terapêutica correta de modo mais célere (Mérien *et al.*, 1992).

A técnica de PCR baseia-se na amplificação de uma sequência de DNA leptospírico presente numa amostra, sendo que no final se obtém um fragmento de DNA amplificado, o qual é detetado num gel de agarose, sob luz ultravioleta. Esta técnica é realizada após extração e purificação do DNA proveniente das

amostras anteriormente mencionadas. A especificidade do protocolo de PCR utilizado para a detecção de leptospiras é determinada pelos *primers* usados, sendo que resultados com uma baixa especificidade está geralmente relacionada com *primers* que apenas detetam o género *Leptospira*, enquanto que a utilização de *primers* que permitem detetar exclusivamente DNA de espécie patogénicas confere uma maior especificidade ao método (Levett, 2001; Aldeia, 2016).

Apesar das inúmeras vantagens dos métodos moleculares, estes também possuem algumas desvantagens, como o elevado custo dos reagentes e equipamentos, bem como a necessidade de manutenção dos mesmos, os quais geralmente, sobretudo em termos de diagnóstico humano, requerem laboratórios especializados e certificados. Desta forma, a utilização deste tipo de metodologia em países de baixa renda não é muito fiável, bem como em laboratórios com um elevado número de amostras na rotina (Levett, 2001; Aldeia, 2016).

1.4.2 - Métodos indiretos

1.4.2.1 - Testes de Rastreio

- **Teste de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto)**

Existem diversos testes de rastreio para leptospirose, dos quais se destacam os de aglutinação macroscópica que podem ter diversos suportes, látex ou mesmo uma lâmina de vidro. Um destes, é o teste designado por MACROLepto, cuja aglutinação ocorre exatamente sobre uma lâmina de vidro. Este teste foi desenvolvido no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (LLBL) no âmbito de um projeto desenvolvido em parceria com a indústria, tendo como finalidade servir como teste de rastreio laboratorial no diagnóstico de leptospirose. Como fundamento, este teste utiliza um *pool* de antigénios, os quais devem ser representativos dos serovares mais prevalentes da região ou do país onde o teste é aplicado, facto que contribui para aumentar a sensibilidade do método. A especificidade, não é elevada, ocorrendo com frequência reações cruzadas com outros microrganismos, o que pode dificultar o entendimento dos resultados obtidos (Gonçalves, 2009), de qualquer modo, sempre que ocorra um resultado positivo ou duvidoso, este deve ser sempre confirmado pelo teste de referência (TAM).

- **Teste ELISA**

De modo análogo, aos testes de aglutinação macroscópica, o teste ELISA é também considerado como teste de rastreio no diagnóstico da leptospirose. Utiliza um antígeno leptospírico que reveste as placas de microaglutinação, ao contrário do teste em lâmina que usa um *pool* antigénico em suspensão. O soro-

problema é colocado em contacto com o antígeno fixo na placa e, após um tempo de incubação, ocorre uma reação antígeno-anticorpo que é observada através da utilização de um conjugado marcado com uma enzima e o respetivo substrato. A reação colorimétrica resultante irá permitir a deteção dos complexos antígeno-anticorpo formados, sendo que a intensidade da cor é proporcional à quantidade de anticorpo presente no soro-problema (WHO, 2003; Vieira, 2006).

○ **Teste de Aglutinação Microscópica (TAM)**

Apesar da sua antiguidade e de algumas desvantagens metodológicas e exigência de recursos quer humanos quer materiais, disponíveis apenas nos laboratórios com estatuto de Laboratórios de Referência existentes em alguns países nos diversos continentes, o Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) continua a ser o teste de referência recomendado pela OMS, para o diagnóstico de leptospirose. Este teste permite a deteção de anticorpos anti-*Leptospira* spp., sendo o único que permite identificar o serogrupo da estirpe infetante, o que constitui uma grande vantagem sobre todos os outros, inclusive em contexto epidemiológico (Collares-Pereira, 1994; Vieira, 2006). Tal como os testes de rastreio descritos anteriormente, a TAM baseia-se igualmente numa reação antígeno-anticorpo, sendo que uma das principais diferenças é o facto de a visualização da aglutinação ser feita em microscópio de fundo escuro. Utilizam-se antígenos vivos que constituem a bateria de referência (constituída por serovares/estirpes representativos de serogrupos com distribuição mundial) os quais vão reagir com os soros diluídos, utilizando-se microplacas de fundo plano (Gonçalves, 2009), como documentado na (Fig. 1.7).

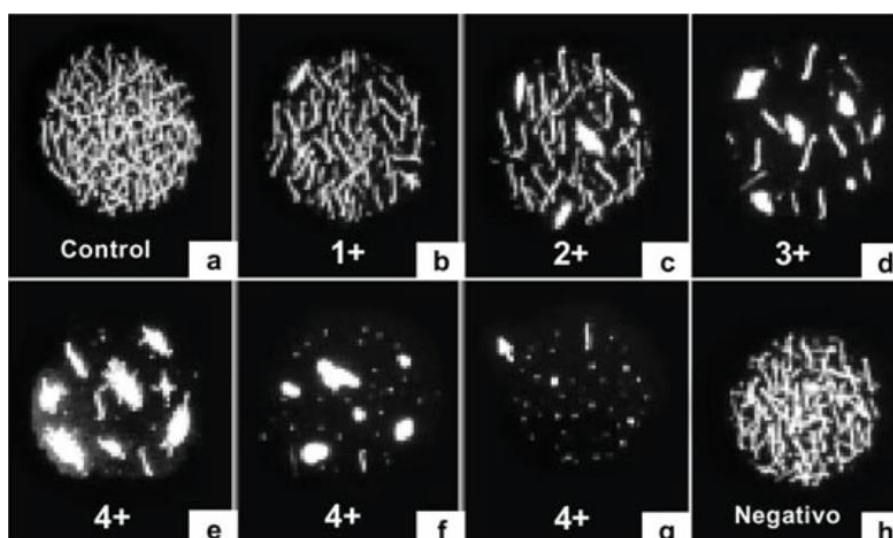


Figura 1.7 - Aspeto dos tipos de reação antígeno-anticorpo, observadas em microscopia de fundo escuro. **a** - Ag total (Controlo); **b-g** - diferentes níveis de aglutinação; **h** – Negativo.

(Adaptado de Céspedes, 2015)

1.5 - Prevenção e Controlo

Erradicar a leptospirose é uma tarefa quase impossível de concretizar dado o número de variáveis bióticas e abióticas que lhe estão inerentes, como é o caso dos mais de 200 serovares patogénicos e a possibilidade de mais de 160 espécies de mamíferos poderem ser infetadas pela bactéria, e no caso dos roedores, o facto de estes se tornarem portadores renais crónicos (assintomáticos), disseminando leptospiros através da urina (para o ambiente) durante toda a vida. Desta forma, o controlo da leptospirose poderá ser feito pela tentativa de reduzir o contacto dos humanos com o agente infeccioso, seja de forma direta ou indireta (Bharti *et al.*, 2003).

No contexto ambiental existem várias medidas que podem ser adotadas no sentido de prevenir a disseminação das leptospiros, destacando-se as seguintes: *i)* identificação das zonas e grupos em risco de contacto com as leptospiros; *ii)* ações de desratização; *iii)* garantia de boas condições sanitárias e de higiene; *iv)* utilização de equipamentos de proteção individual, no caso dos grupos profissionais de risco; *v)* tratamento e vacinação de animais; e, por último *vi)* a realização de ações de sensibilização junto da população e dos profissionais de saúde (Bharti *et al.*, 2003).

No que diz respeito à vacinação para prevenção da leptospirose em humanos, sabe-se que esta se encontra num estágio inicial, em diversos países. Vários estudos têm demonstrado uma total ineficácia na proteção cruzada para diversos serogrupos (Bharti *et al.*, 2003, Hartskeerl *et al.*, 2011). Contudo, o facto das leptospiros estarem associadas a mecanismos complexos de imunidade, sendo esta serovar específica o que é outro inconveniente na produção de uma vacina eficaz. Por exemplo, a vacinação em animais (domésticos ou de produção animal) apenas previne os sintomas, mas não é totalmente capaz de evitar a leptospiúria, o que se traduz na continuação da capacidade de transmissão da bactéria aos humanos. Desta forma, as maiores dificuldades inerentes à produção de uma vacina eficaz no controlo da leptospirose, estão principalmente relacionadas com a sua capacidade de ser polivalente, protegendo os humanos contra vários serovares e simultaneamente ser duradoura (Shieh *et al.*, 2006; Vijayachari *et al.*, 2008; Xu & Ye, 2018).

No que respeita aos roedores, o controlo e prevenção assume uma dinâmica distinta, a qual deverá sempre integrar o contexto ambiental, económico e social de uma determinada região. O saneamento básico inexistente ou deficiente, a gestão de resíduos, além da escassez de higiene numa determinada zona, são fatores fundamentais para a disseminação de roedores, os quais acarretam prejuízos monetários, além de serem portadores de diversos agentes de doenças infecciosas (bactérias, protozoários, vírus). A leptospirose é assim, apenas um exemplo, sendo uma zoonose de impacto mundial, diretamente associada à presença dos referidos micromamíferos. Desta forma, controlar os roedores torna-se fundamental para a prevenção da ocorrência da doença, além de ser uma forma de garantir a melhoria económica e sanitária de uma determinada região (Crespo, 2012).

O controlo da população de roedores está dependente de vários aspetos, tais como, a biologia, hábitos comportamentais e a identificação das espécies presentes na região que se pretende controlar. Estas informações serão de extrema utilidade no planeamento das ações de controlo mais eficazes para determinado local, garantindo assim o sucesso do mesmo. As diferentes espécies de roedores possuem características próprias no que respeita ao habitat, alimentação, ou nível comportamental, as quais têm de ser tidas em conta nas diversas decisões da estratégia de controlo tais como: *i)* local onde as capturas serão feitas; *ii)* qual o número de armadilhas necessárias e a distância entre elas; *iii)* o tipo de armadilha mais indicado consoante a espécie e até o antídoto (por exemplo, rodenticida) a utilizar (SRAFAM, 2012; Crespo, 2012).

Assim, o controlo de praga de roedores e, consequentemente da transmissão das leptospiros num determinado local está dependente de uma abordagem abrangente e integrada, a qual utiliza diferentes medidas. Desta forma, a par da utilização de rodenticidas é igualmente necessário eliminar os fatores ambientais propícios à manutenção da população de roedores na região. É, por isso, importante garantir o cumprimento das cinco etapas necessárias para o controlo eficaz dos roedores: *i)* inspeção; *ii)* identificação; *iii)* medidas preventivas; *iv)* desratização; e *v)* monitorização (SRAFAM, 2012; Crespo, 2012).

A inspeção pressupõe a visualização da região, na tentativa de se encontrar evidências da presença de roedores, bem como estabelece a análise dos trilhos, fontes de alimentação e locais que sirvam de abrigo. Na fase da identificação, é feita a distinção das espécies presentes na região, as quais permitem obter o conhecimento necessário para se tomarem as medidas corretas de desratização. A fase seguinte (medidas preventivas) relaciona todos os meios preventivos e corretivos necessários para impedir a disseminação de roedores numa determinada região. Alguns exemplos são: correto acondicionamento do lixo, canalização da água, limpeza dos terrenos baldios, entre outros. Após a desratização, utilizando ratoeiras, armadilhas ou rodenticidas para eliminar a população de roedores numa determinada região, é necessário realizar a última etapa, a avaliação e monitorização. Esta última fase é fundamental para avaliar os resultados obtidos, sendo necessário continuar uma vigilância periódica, de forma a evitar-se novas infestações (SRAFAM, 2012; Crespo, 2012).

1.6 - Justificação do tema da Dissertação

Da revisão da literatura que acaba de ser feita, fica a perceção de que a leptospirose é uma doença infecciosa zoonótica, emergente e de distribuição global que está presente sobretudo, em países de clima tropical e temperado. É provocada por espiroquetas patogénicas pertencentes ao Género *Leptospira*, cujos sintomas podem variar de ligeiros a moderados, incluindo febre, dores de cabeça, mialgias, mas que pode levar a situações potencialmente fatais. Atualmente, a doença afeta mais de um milhão de pessoas em todo o mundo. A principal fonte de infeção para os humanos e outras espécies animais é o contacto com urina ou

vísceras de animais colonizados ou infetados com estas bactérias, como é o caso de roedores (reservatórios naturais) ou animais domésticos e de produção pecuária, respetivamente. Também a exposição a coleções de água doce e a solos húmidos contaminados com leptospiros, pode ser um potencial risco de infeção.

O diagnóstico da doença não é simples, dada a sobreposição de sinais e sintomas que leva muitas vezes a confundi-la com outras doenças, sendo que a leptospirose apesar de ser uma DDO, também em Portugal, é muitas vezes subdiagnosticada e, por consequência, também subnotificada como se constata pelos dados oficiais respeitantes à sua prevalência no país. Considera-se, pois, pertinente conhecer melhor o respetivo espectro epidemiológico, para que também o diagnóstico laboratorial (imunológico e/ou molecular) dos indivíduos afetados, possa ser cada vez mais assertivo, conhecidas que sejam as diferentes espécies circulantes de *Leptospira* no país, nomeadamente, em contexto ambiental (água e solos). E é este fundamentalmente o desafio proposto e que alicerçou a elaboração da presente Dissertação.

1.6.1 - Objetivos

Com este estudo pretende-se conhecer de forma integrada a distribuição geográfica de leptospiros patogénicas em áreas distintas de dois distritos de Portugal continental (Lisboa e Setúbal) e as potenciais fontes de transmissão (de natureza biótica e abiótica) com impacte na população humana. Para a concretização do referido objetivo, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- i) Recolher amostras de água em coleções de água doce (rios, riachos, pequenos lagos e outros espaços aquáticos), e de solo húmido nas proximidades das referidas coleções de água;
- ii) Capturar roedores nas referidas localizações e, sempre que possível, na proximidade dos locais onde foram colhidas as amostras ambientais (água e/ou solo);
- iii) Detetar e identificar a presença de *Leptospira* spp. (taxa bacteriana) nas amostras de tecido renal dos roedores silváticos e nas amostras ambientais, através de métodos moleculares [PCR com *primers* universais para o Género *Leptospira* e específicos “LipL32” para espécies patogénicas] e posterior sequenciação para possível determinação das espécies patogénicas de *Leptospira* mais prevalentes nos locais prospetados.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

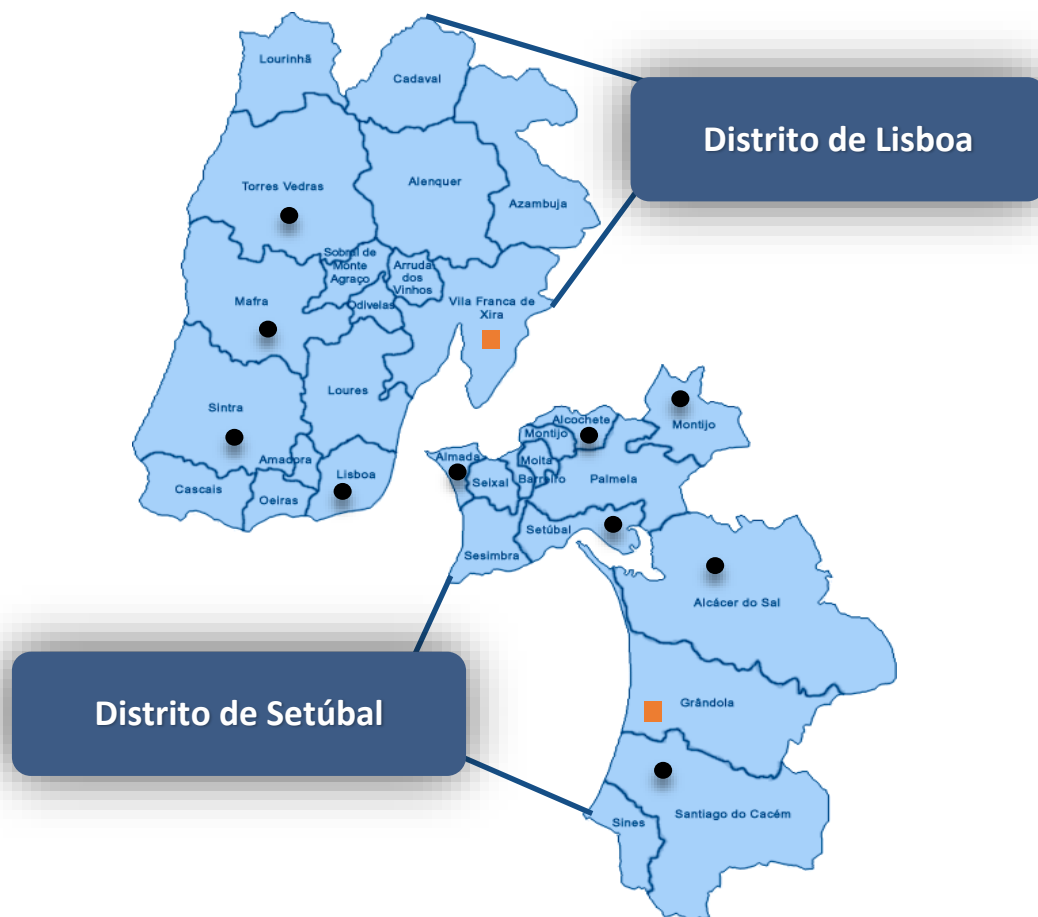
A. Componente de campo

2.1 - Área geográfica do estudo

O presente trabalho, na sua componente de campo, foi integrado num projeto de doutoramento em curso no LLBL (IHMT), que contempla uma área geográfica mais extensa (diversos distritos de Portugal continental) com objetivos gerais e específicos distintos dos desta Dissertação, incluindo a prospeção de amostras ambientais e de roedores dos distritos de Lisboa e Setúbal, entre outros, pelo que se estabeleceu uma sinergia em termos de trabalho de campo, no que respeita a colheitas, deslocações e transporte das amostras para o laboratório.

Assim, por razões de ordem logística, a escolha destes dois distritos, para a realização deste estudo, teve em consideração também a zona de residência do autor do mesmo, a par do facto de serem regiões geográficas relativamente bem conhecidas do próprio. Outro fator que também influenciou esta escolha foi a proximidade ao IHMT, local onde todas as amostras foram analisadas e cujo tempo de deslocação deveria ser o mais curto possível para garantir a boa qualidade dos materiais recolhidos, não obstante o bom acondicionamento dos mesmos.

Foram selecionados os distritos de Lisboa e de Setúbal, que compreendem um total de 29 concelhos distribuídos por uma área estimada de 7 825 Km². Nos referidos distritos (Fig. 2.1) foram assinalados os concelhos onde foram obtidas as diferentes amostras, de forma a documentar-se geograficamente a extensão do estudo.



- Coleções de água doce, solos e roedores
- Solos

Figura 2.1 – Representação gráfica dos distritos seleccionados (Lisboa e Setúbal) com indicação dos locais onde foram recolhidas as amostras de água e solos, e realizada a captura de roedores.

2.2 – Procedimentos legais e éticos para prospeção de amostras ambientais e de roedores

Foram obtidos três tipos diferentes de amostras: *i*) amostras de coleções de água doce; *ii*) amostras de solos na proximidade das referidas coleções e, *iii*) a captura de pequenos mamíferos (roedores).

Selecionados os locais para a obtenção de amostras quer de natureza ambiental (água e solo) quer de roedores, houve necessidade de estabelecer contactos com Entidades oficiais e requerer as respetivas autorizações e licenças para o efeito. Assim, no que diz respeito à captura de roedores foram contactadas a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) e o Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). Esta última Instituição após a receção dos formulários e requerimento e considerados os objetivos do estudo, emitiu a respetiva Licença para captura e eutanásia de roedores [Licença nº 240/2019/CAPT (Métodos não Seletivos)], conforme (ANEXO I).

A par da obtenção da referida Licença, foi também submetido o projeto da presente Dissertação à Comissão de Ética da NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas [(NMS|FCM-UNL) (CEFCM)], para a devida apreciação, tendo o mesmo sido aprovado (Proc.º nº (07/2019/CEFCM) conforme (ANEXO I).

2.3 - Locais de amostragem e material coletado

Dada a extensão geográfica dos distritos escolhidos, selecionaram-se aleatoriamente diversos concelhos onde se efetuou recolha de amostras e a captura de roedores.

Foram selecionados quatro e seis concelhos dos distritos de Lisboa e Setúbal, respetivamente, para a recolha de amostras em coleções de água doce. No distrito de Lisboa os concelhos selecionados foram: Lisboa, Sintra, Mafra e Torres Vedras; e no distrito de Setúbal foram os concelhos de Almada, Montijo, Alcochete, Setúbal, Alcácer do Sal e Santiago do Cacém.

Para as amostras de solo, foram selecionados os mesmos concelhos onde já haviam sido obtidas amostras de coleções de água doce, com a exceção do concelho de Vila Franca de Xira do distrito de Lisboa e o concelho de Grândola do distrito de Setúbal, que foram adicionados posteriormente.

Quanto à captura de roedores, a mesma teve lugar nos mesmos concelhos escolhidos para a obtenção de amostras provenientes de coleções de água. Foram assim construídas três tabelas distintas com as informações de cada ponto de amostragem, contendo as seguintes variáveis: número da amostra, hora da colheita, coordenadas geográficas, distrito e concelho a que cada amostra corresponde.

2.4 - Coleções de água doce

2.4.1 – Calendarização e metodologia para obtenção de amostras de água

A colheita de amostras de água doce foi iniciada no dia 27 de outubro de 2018 e estendeu-se até ao dia 2 de abril de 2019, inclusive. As amostras foram recolhidas nas margens e à superfície de lagos, lagoas, rios e ribeiros, ou em fontanários e bebedouros públicos. A técnica de amostragem utilizada consistiu na utilização de tubos *Falcon*® estéreis de 15mL, para a recolha de 10 a 13mL de água na margem e na superfície dos afluentes, nunca ultrapassando os 5 cm de profundidade.

Para a colheitas de amostras provenientes de coleções de água doce, os locais de amostragem escolhidos tiveram por base as características dos afluentes tais como: *i)* tipologia das coleções de água; *ii)* localização; *iii)* flora e fauna envolvente; e *iv)* a facilidade de acesso às mesmas, pela população. Foram

recolhidas amostras de diferentes origens de água doce, tais como: rios, lagos, fontanários, bebedouros, saída de esgotos, entre outros como documentado na Figura 2.2.



Figura 2.2 – Exemplos de locais onde foram realizadas recolhas de amostras de água doce. *(Fotografias originais do autor)*

Todos os tubos com as amostras de água foram etiquetados com a atribuição de um número sequencial, a este número estão associados todos os parâmetros físico-químicos recolhidos e introduzidos numa tabela já anteriormente mencionada. Os tubos foram acondicionados sob refrigeração, em mala térmica, mantendo-se nestas condições durante o transporte até ao laboratório (LLBL) do IHMT-UNL, local onde se procedeu à respetiva análise laboratorial.

O total das amostras obtidas foram analisadas num período de tempo não superior a 48h após a sua recolha, garantindo a preservação dos agentes bacterianos em estudo, mas também submetidas a uma análise preliminar, ainda no local de recolha, para determinação de alguns parâmetros físicos e químicos (pH e Nitritos), (Fig.2.3) registando-se também a tipologia da mesma (água corrente ou estagnada), temperatura, cor, turbidez e sedimentos da água e ainda a temperatura e humidade do ar.

Para a medição do pH das amostras foram utilizadas tiras indicadoras deste parâmetro, da marca *MColorphastTM*. A medição do teor de Nitritos, foi determinada através de tiras indicadoras da marca *MQuantTM*.



Figura 2.3 - Kit's utilizados para a medição do pH e dos Nitritos.
(Fotografias originais do autor)

2.5 – Solos

2.5.1 - Calendarização e metodologia para obtenção de amostras de solo

A colheita de amostras de solo foi iniciada no dia 26 de janeiro de 2019 e estendeu-se até ao dia 11 de maio de 2019, inclusive. As amostras foram recolhidas na proximidade dos locais onde se procedeu a recolha de amostras de água com exceção do concelho de Vila Franca de Xira e Grândola. A técnica de amostragem utilizada consistiu na utilização de tubos *Falcon*® estéreis de 15mL, para a recolha de 5 a 15 gramas de solo, nunca ultrapassando os 5cm de profundidade.

Para a obtenção das amostras de solo, foram igualmente consideradas algumas características, tais como: *i)* a granulagem; *ii)* o nível de humidade (1 a 5, sendo 1-seco e 5-encharcado) a que o solo se encontrava; e *iii)* as características do meio envolvente, como ilustrado na Figura 2.4.



Figura 2.4 - Exemplos de locais onde foram realizadas recolhas de amostras de solo.
(Fotografias originais do autor)

À semelhança da metodologia para obtenção das amostras de água, todos os tubos com amostras de solo foram etiquetados com a atribuição de um número sequencial, ao qual estão associados todos os parâmetros físico-químicos recolhidos e introduzidos numa tabela já anteriormente mencionada.

Os meios de acondicionamento e transporte utilizados para as amostras de solo foram idênticos aos utilizados para as amostras de água, tal como a análise preliminar de alguns parâmetros físicos e químicos (pH e Nitritos) como também o registo do nível de humidade do solo, temperatura e o tamanho da granulagem dos sedimentos

Para a medição do pH e nitritos das amostras de solo foram utilizados os mesmos *Kit's* usados nas amostras de água.

2.6 – Roedores

2.6.1 - Calendarização e metodologia para a captura de roedores

O material necessário para o presente trabalho incluiu ainda a captura de roedores na proximidade dos locais onde foram recolhidas amostras de água doce e de solos, a mesma teve início no dia 14 de abril de 2019 e estendeu-se até ao dia 30 de junho de 2019, inclusive.

Para o efeito, foram utilizadas armadilhas tipo *Sherman*[®] e *Tomawhack*[®] destinadas a murganhos e a ratos, respetivamente. Estas armadilhas são feitas de uma armação de aço galvanizado com um sistema interior com alavanca, que permite o fecho das mesmas após a entrada do animal, impossibilitando-o de sair.

Na captura de roedores foram utilizadas 4 armadilhas do tipo *Sherman*[®] e 4 armadilhas do tipo *Tomawhack*[®], preparadas com isco composto por sardinha em conserva, e colocadas na proximidade dos locais de obtenção das amostras de água, após serem consideradas as características dos locais face ao que se conhece sobre os hábitos e preferências dos potenciais espécimes a capturar, nomeadamente: *i)* presença/ausência de vegetação; *ii)* proximidade de cursos de água; *iii)* presença/ausência de predadores; e *iv)* presença/ausência de trilhos criados por animais, como ilustrado na Figura 2.5.



Figura 2.5 - Exemplificação de locais onde foram colocadas armadilhas para a captura de roedores. (*Fotografias originais do autor*)

As armadilhas foram colocadas nos locais previamente seleccionados entre as 19 horas e as 7 horas da manhã (período noturno), sendo observadas de duas em duas horas para verificar: *i)* presença/ausência de

roedor; *ii*) presença/ausência de isco no interior da armadilha; e *iii*) se o sistema de alavanca da armadilha estava acionado ou por acionar (Fig. 2.6).



Figura 2.6 – Observação de armadilhas com a presença de roedores.
(Fotografias originais do autor)

Nos locais onde se verificou a captura de roedores, foram recolhidos alguns parâmetros ambientais: *i*) presença/ausência de vegetação; *ii*) proximidade de cursos de água; *iii*) fauna existente no local; climáticos: *iv*) temperatura e humidade do ar; e os principais parâmetros morfométricos de cada espécime.

2.6.2 - Eutanásia e necropsia

Após se verificar a captura dos animais, cada espécime foi transferido para uma caixa estanque (Fig. 2.7), onde de seguida, utilizando uma sobredosagem de anestésico (Isoflurano®), cada animal foi individualmente eutanasiado, sendo a morte confirmada através da técnica de deslocamento da cervical.



Figura 2.7 - Exemplo de um dos roedores capturados dentro da caixa estanque utilizada para a eutanásia. (Fotografia original do autor)

Logo após a confirmação da morte do animal, deu-se início à recolha e registo numa tabela preparada para o efeito, dos dados morfológicos: *i)* peso do espécime; *ii)* comprimento total do corpo; *iii)* comprimento da cauda; *iv)* comprimento da orelha; *v)* comprimento da pata posterior, como ilustrado na Figura 2.8, seguindo-se a recolha das amostras biológicas, tais como: *i)* sangue; *ii)* urina (quando possível); *iii)* baço; *iv)* rim; *v)* fígado; e *vi)* pulmão, utilizando material cirúrgico estéril apropriado para o procedimento (Fig. 2.9 e Fig. 2.10).



Figura 2.8 – Exemplo de pesagem de um espécime *Mus musculus* capturado. (Fotografia original do autor)



Figura 2.9 – Exemplo de recolha de sangue por punção cardíaca em *Mus musculus*. (Fotografia original do autor)



Figura 2.10 - Necrópsia para recolha de órgãos em *Mus musculus*. (Fotografia original do autor)

Para a recolha das amostras biológicas foram utilizados tubos *ependorf* estéreis de 2mL devidamente etiquetados. O acondicionamento das mesmas necessitou de meios de conservação diferentes, como é o caso das amostras de sangue recolhidas de cada espécime, contendo 10µL de anticoagulante (Heparina®) cada. Em relação às amostras de urina, os tubos *ependorf* encontravam-se vazios, enquanto que para as restantes amostras biológicas de tecido sólido, os mesmos continham PBS, à exceção de quando era pretendido utilizar, uma destas últimas amostras, para cultura, situação em que se acondicionava a mesma em meio EMJH.

Após a recolha, todas as amostras foram colocadas em caixa térmica a 4°C, e transportadas para o LLBL no IHMT, e processadas num período não superior a 24 horas.

B. Componente laboratorial

2.7 - Extração de DNA genómico

2.7.1 - Amostras de água

Com o objetivo de eliminar potenciais contaminantes, bem como garantir que os detritos de maiores dimensões seriam retirados das amostras de água, procedeu-se a uma etapa prévia de centrifugação, de forma a garantir a qualidade das amostras que iriam ser submetidas a técnicas moleculares. Assim, após a chegada ao laboratório, as amostras foram centrifugadas a 2000rpm durante cinco minutos. Após a centrifugação, recolheu-se 1mL do sobrenadante, o qual foi transferido para um tubo *ependorf* de 1,5mL. O *ependorf* foi refrigerado até à etapa seguinte de extração de DNA das amostras.

O kit comercial utilizado para a extração de DNA das amostras de água foi o *Citogene® DNA Cell & Tissue Kit*, através do procedimento de purificação de DNA a partir de amostras biológicas (soro, sangue total, urina, entre outros), apesar de este não ter sido elaborado especificamente para amostras de água, já foi utilizado com sucesso, no passado, em amostras desta natureza.

Foram adicionados 100µL de amostra de água (proveniente da coleção de água doce) a 500µL de *Cell Lysis*, de forma a lisar as células existentes. Devido à quantidade baixa de DNA existente nestas amostras de água, foi de seguida adicionada 3µL da enzima *Proteinase K*, seguindo-se uma incubação de 55°C durante 1h.

Após a incubação, e de forma a obter maior rendimento na extração de DNA, adicionou-se a enzima *RNAse* (3µL) onde foi feita uma homogeneização, e de seguida uma incubação a 37°C durante 20min. As amostras ficaram posteriormente à temperatura ambiente durante 5min, onde depois foi adicionado 200µL do reagente *Protein Precipitation*, o qual permitiu remover as proteínas existentes na amostra.

Para permitir a precipitação das proteínas, utilizou-se o vórtex, a velocidade elevada, agitando-se as amostras durante 20seg, seguindo-se uma incubação em gelo de 10 minutos. Após este tempo, realizou-se uma centrifugação das amostras durante 6 minutos a uma velocidade de 14500rpm, de forma a obter-se um *pellet* de proteínas.

O sobrenadante, com o DNA, foi decantado para um *eppendorf* contendo 600μL de Isopropanol a 100% e, uma vez mais, admitindo-se uma quantidade de DNA inferior a 20μg, adicionou-se 1μL de glicogénio de forma a aumentar o rendimento.

Após obter a mistura por inversão dos tubos e uma incubação 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas novamente a 14500rpm durante 6 minutos, com o objetivo de se obter um *pellet* de DNA. O sobrenadante foi então decantado cuidadosamente e adicionou-se 600μL de etanol a 70%, com o objetivo de lavar o *pellet*, seguindo-se uma homogeneização.

As amostras foram, por fim, centrifugadas durante 3 minutos a 14500rpm e o etanol foi decantado, invertendo-se cuidadosamente o tubo. Procedeu-se então à secagem do *pellet* de DNA durante 15min em vácuo, eluindo-o de seguida com 20μL de solução *DNA Hydration*. Antes de colocar a 4°C, o DNA eluído foi deixado *overnight* à temperatura ambiente.

2.7.2 – Amostras de solo

O *kit* comercial da marca *Nzytech*® *NZY Soil and gDNA Isolation Kit* foi utilizado para a extração de DNA das amostras de solo. Este *kit* foi desenvolvido pela marca, para a extração de DNA de diversos tipos de solo (Fig. 2.11), mas foi necessário adaptá-lo ao tipo de solo recolhido. Desta forma, procedeu-se inicialmente a uma otimização do *kit*, de forma a perceber qual a quantidade ideal de amostra de solo a utilizar, bem como qual o *buffer* (*NSL1* ou *NSL2*) indicado para um maior rendimento do DNA extraído.



Figura 2.11 - Exemplos de amostras de solo recolhidos antes do início de extração de DNA. (Fotografia original do autor)

Desta forma, inoculou-se 100µL de uma estirpe de *L. interrogans* (numa concentração de 10⁶) numa amostra de 1000mg de solo, a qual ficou durante 1h à temperatura ambiente. De seguida, iniciou-se o protocolo descrito no *kit*, tendo-se utilizado o *buffer NSL1* em 500mg da amostra e o *buffer NSL2* na restante porção. Utilizou-se a quantidade máxima de amostra de solo indicada pelo fabricante. O *buffer NSL1* demonstrou um melhor desempenho para o tipo de solo analisado, comparado com o *buffer NSL2*, obtendo-se maior quantidade de DNA amplificado com o primeiro reagente. Desta forma, o *buffer NSL1* foi utilizado para a extração de DNA de todas as amostras de solo recolhidas.

A extração de DNA iniciou-se com a preparação da amostra de solo, a qual se encontrava refrigerada a 4°C num tubo Falcon®. Retirou-se de cada amostra original, uma porção entre 250mg a 500mg, pesada no *NZYSpin Soil Bead Tube*, um tubo fornecido pelo *kit* que contém esferas de cerâmica, as quais atuam na disrupção das células para a libertação do DNA existente. Logo após a pesagem do solo, foi adicionado 150µL do reagente de lise, seguindo-se uma etapa de agitação no vórtex (5min), de forma a permitir que o DNA presente no solo seja liberto.

De forma a eliminar os contaminantes presentes nas referidas amostras, procedeu-se a uma centrifugação de 2 minutos a 14500rpm e à adição de 150 µL do *buffer NSL3*. A amostra foi novamente homogeneizada no vórtex por 5 segundos, tendo-se seguido uma etapa de incubação a 4°C durante 5 minutos e uma centrifugação de 1 minuto a 14500rpm.

Iniciou-se depois o passo de filtração do lisado, de forma a purificar o DNA presente na amostra. Desta forma, transferiu-se 700µL do sobrenadante para a coluna contendo um filtro (*NZYSpin Soil Inhibitor Removal Column*) e centrifugou-se durante 1 minuto a 14500rpm, descartando-se a coluna.

De forma a ajustar a capacidade de ligação do DNA à coluna, adicionou-se 550µL do *buffer NSB* e homogeneizou-se a amostra no vórtex durante 5 segundos. O filtrado (550µL) foi de seguida transferido para uma nova coluna e centrifugado a 14500rpm durante 1 minuto. Foi então descartado o filtrado e deu-se início à lavagem e secagem do DNA na membrana de sílica. Desta forma, adicionou-se 500µL de *buffer NSB* e centrifugou-se durante 30 segundos a 14500rpm, seguindo-se a adição de 550µL de *buffer NSW1* e novamente uma centrifugação de 30 segundos a 14500rpm. Por fim, adicionou-se 700µL do *buffer NSW2* à coluna e centrifugou-se 30 segundos a 14500rpm, repetindo-se a centrifugação por 2 minutos para uma secagem mais eficaz da membrana.

O DNA foi de seguida eluído com 30µL de *buffer NSE* seguido de uma centrifugação de 30 segundos a 14500rpm, sendo o DNA extraído conservado a 4°C.

2.7.3 - Amostras biológicas (roedores)

O procedimento de extração de DNA dos órgãos dos roedores capturados, bem como das amostras de sangue e urina, teve início nas 24h após a eutanásia e a necropsia, de forma a prevenir degradação das referidas amostras. Para realizar a extração de DNA dos órgãos dos roedores, bem como das amostras de sangue e urina, foi utilizado o kit comercial da marca *Citogene® DNA Cell & Tissue Kit*. O procedimento de purificação de DNA a partir das amostras (soro, sangue total, urina, entre outros) foi utilizado também para a extração de DNA do sangue e urina recolhidos e o procedimento de purificação de DNA a partir de tecido sólido (1-5mg) foi utilizado para a extração de DNA dos órgãos dos roedores (baço, rins, fígado, pulmões).

Desta forma, os órgãos transportados em PBS até ao laboratório foram inicialmente pesados e foi retirada uma amostra de 2mg de cada órgão para ser utilizada na extração de DNA (Fig. 2.12). Quer a pesagem e o corte longitudinal dos órgãos foram realizados numa câmara de fluxo laminar, na presença de um bico de *Bunsen*, de forma a manter o ambiente estéril.

Cada amostra de 2g obtida de cada órgão foi de seguida colocada num tubo contendo 1,5mL do reagente *Cell lysis*. De forma a obter um máximo rendimento do DNA extraído, adicionou-se 0,75µL da enzima *Proteinase K*, seguindo-se uma incubação a 55°C *overnight*, com a finalidade de garantir a eficaz lise das células presentes no tecido animal.



Figura 2.12 – Exemplo de pesagem do rim de um dos roedores capturado e porção utilizada no protocolo de extração de DNA. (Fotografias original do autor)

No dia seguinte, o procedimento continuou com a adição de 0,75µL da enzima *RNAse* ao lisado celular, seguida de homogeneização do tubo e nova incubação durante 1 hora a 37°C. Após o período de incubação as amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente durante 5 minutos e logo de seguida adicionaram-se 50µL de *Protein Precipitation*, para precipitar as proteínas presentes nas amostras.

As amostras foram agitadas no vórtex a velocidade elevada durante 20 segundos, garantindo-se a correta homogeneização, seguindo-se uma incubação em gelo durante 5 minutos. As amostras foram de seguida centrifugadas durante 4 minutos a 14500rpm e o sobrenadante decantado para um novo tubo contendo 150µL de Isopropanol a 100%. De forma a prevenir um rendimento baixo de DNA extraído (<1 µg), foi adicionado 0,5µL de glicogénio às amostras.

As amostras foram homogeneizadas cuidadosamente por inversão dos tubos (50 vezes) e de seguida centrifugadas durante 6 minutos a 14500rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA lavado com 150µL de etanol a 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para uma lavagem eficaz.

Seguiu-se uma nova centrifugação a 14500rpm durante 2 minutos, tendo-se descartado novamente o sobrenadante, cuidadosamente, de forma a não soltar o *pellet* de DNA. Os tubos foram de seguida secos a vácuo durante 15min, eluindo-se posteriormente o DNA com 30µL de *DNA Hydration*. As amostras ficaram a incubar *overnight* à temperatura ambiente, e posteriormente refrigeradas a 4°C até posterior análise.

A extração de DNA a partir das amostras de sangue e urina seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente para as amostras provenientes de coleções de água doce, com exceção do período de incubação após a adição do reagente *Cell Lysis* e da enzima *RNAse*. O reagente *Cell Lysis* ficou assim a incubar *overnight* a 55°C, pretendendo-se obter no final uma maior eficácia na lise celular. De igual modo, após a adição da enzima *RNAse*, as amostras de sangue e urina foram incubadas durante 1h a 37°C. O restante procedimento seguiu o anteriormente descrito para as amostras de água.

2.8 – Amplificação de DNA leptospírico

2.8.1 – Teste de sensibilidade

Antes de utilizar os *primers* escolhidos para a amplificação de DNA leptospírico nas amostras de água, solo e amostras biológicas (roedores) foi inicialmente realizado um teste de sensibilidade. Para isso, foram utilizados *primers* específicos, tendo como alvo o gene *lipL32* o qual é comum a todas as espécies patogénicas do género *Leptospira*. Por uma questão prática, neste manuscrito o protocolo de PCR, utilizando estes últimos *primers*, é designado por “LipL32”.

Para o teste de sensibilidade, foi selecionada uma cultura de leptospiros de uma espécie patogénica (*Leptospira interrogans*) na qual se começou por determinar a densidade ótica num espectrofotómetro SmartSpec™ Spectrophotometer, BIORAD.

Preparam-se, de seguida, diluições seriadas a partir de uma amostra de 10^7 células/mL até à diluição de 10^0 células/mL. Foi então realizada a extração e purificação de DNA destas diluições, utilizando o mesmo *kit* comercial usado para as amostras de água. Seguiu-se a amplificação do DNA (extraído) por *nested*-PCR. Os produtos amplificados resultantes da PCR foram então sujeitos a separação electroforética, no equipamento BioRad®, em gel de agarose a 2%, durante 45 min, a 125 volts. Foram utilizados o corante *GreenSafe Premium™* e o marcador de peso molecular *HyperLadder* (100-1000b para o protocolo “LipL32”), para identificar, por comparação, a dimensão do(s) fragmento(s) amplificado(s). Foram utilizados 4µL do produto amplificado aos quais se adicionou 2µL de tampão de amostra (*loading buffer*). O gel foi depois visualizado sob luz ultravioleta (UV), utilizando o equipamento *Dolphin-DocGel Image System*, da *Wealtec®*.

2.8.2 – Teste de especificidade

Para o teste de especificidade foram utilizados dois controlos negativos contendo água estéril, uma amostra de DNA de *L. biflexa* (Patoc) e uma amostra de DNA de uma outra espiroqueta *Borrelia burgdorferi* s.l., nas mesmas reações de *nested*-PCR utilizadas para o teste de sensibilidade, de forma a verificar a especificidade ou não, dos *primers* seleccionados para amplificação de DNA leptospírico. Após a *nested*-PCR, os produtos amplificados foram sujeitos a eletroforese e observação em UV nas condições anteriormente descritas.

2.8.3 – Amplificação de DNA de amostras de água e solo

2.8.3.1 - *Nested*-PCR com *primers* universais (A e B)

Após a extração de DNA das amostras de água e solo, procedeu-se à amplificação do mesmo. Desta forma, utilizou-se numa primeira fase um protocolo de *nested*-PCR com *primers* universais (A e B) de uma região bastante conservada para o Género *Leptospira*.

Na 1ª reação de PCR foi preparada uma solução (*mix*) para um volume final de 25µL por cada amostra a ser testada. Desta forma, num *ependorf* de 0,2mL foi colocada a solução (*mix*), que continha: H₂O autoclavada, *Buffer* 10X (Bioline®), MgCl₂ 50mM (Bioline®), DNTP's 100mM (Bioline®), *Primer* A 100µM, *Primer* B 100µM, *Taq polimerase* 5U/µL (Bioline®) e 2,5µL de amostra (DNA) ou *template*.

A 2ª reação de PCR foi realizada utilizando-se uma solução (*mix*) com os mesmos componentes anteriormente descritos para a 1ª reação e também para um volume final de 25µL. No entanto, utilizaram-se 3µL do produto anteriormente amplificado e *primers* A1 e B1 (amplificando uma região interna da região amplificada inicialmente).

Foram utilizados dois controlos negativos por cada reação de PCR, bem como um controlo positivo. Foi utilizada água autoclavada como *template* dos controlos negativos e uma amostra contendo *L. interrogans* para o controlo positivo.

A amplificação de DNA leptospírico nas duas reações do protocolo de *nested*-PCR foi realizada com o auxílio do termociclador *MyCycler*, o qual foi programado segundo as condições descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Condições necessárias para a 1ª e 2ª reações do protocolo *nested*-PCR com os *primers* universais (A e B).

Número de ciclos	Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Tempo
1 ciclo	Desnaturação inicial	94	3 min
30 ciclos	Desnaturação	94	1 min
	Emparelhamento	63	90 seg
	Extensão	72	1 min
1 ciclo	Extensão final	72	10 min

2.8.3.2 - *Nested*-PCR com *primers* específicos “LipL32”

Cada amostra de água/solo onde se verificou amplificação de DNA leptospírico com os *primers* universais (A e B), foi de seguida submetida a um novo protocolo de *nested*-PCR, no qual foram utilizados *primers* específicos, designados “LipL32”. Estes *primers*, como já referido, têm assim, como alvo o gene *lipL32*, o qual está presente apenas nas espécies patogénicas de *Leptospira*.

Na 1ª reação de PCR foi preparada uma solução (*mix*) para um volume final de 25µL por cada amostra a ser testada. Num *ependorf* de 0,2mL foi colocada a solução (*mix*), com: H₂O autoclavada, Buffer 10X (Bioline®), MgCl₂ 50mM (Bioline®), DNTP's 100mM (Bioline®), *Primer lipL32F* 100µM, *Primer lipL32R* 100µM, *Taq polimerase* 5U/µL (Bioline®) e 10µL de amostra ou *template*.

Para a 2ª reação de PCR utilizou-se uma solução (*mix*) com os mesmos componentes descritos anteriormente na 1ª reação e igualmente para um volume final de 25µL. No entanto, utilizou-se 1µL da amostra anteriormente amplificada e *primers* LipL32F1 e LipL32R1 (amplificando uma região interna à amplificada na primeira reação).

Foram utilizados dois controlos negativos por cada reação de PCR, bem como um controlo positivo. A amplificação de DNA leptospírico nas duas reações do protocolo de *nested*-PCR foi realizada no Termociclador *MyCycler*, o qual foi programado segundo as condições descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Condições necessárias para a 1ª e 2ª reações do protocolo *nested*-PCR com os *primers* específicos “LipL32F e LipL32R”.

Número de ciclos	Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Tempo
1 ciclo	Desnaturação inicial	94	5 min
32 ciclos	Desnaturação	94	1 min
	Emparelhamento	55	1 min
	Extensão	72	1 min
1 ciclo	Extensão final	72	7 min

Os produtos amplificados resultantes de ambos os protocolos de *nested*-PCR foram sujeitos a eletroforese e observação em UV nas condições anteriormente descritas.

2.8.4 – Amplificação de DNA de amostras de órgãos e fluidos biológicos

2.8.4.1 - *Nested*-PCR com *primers* universais (A e B)

Após a extração de DNA dos órgãos de roedores, bem como das amostras de sangue e urina, pretendeu-se amplificar o DNA leptospírico presente nas mesmas. Desta forma, utilizou-se o mesmo protocolo anteriormente descrito para a análise molecular nas amostras provenientes das coleções de água e solos, com algumas alterações nas concentrações e *template* (DNA molde) utilizado, de forma a reduzir a quantidade de DNA e ainda minimizar a presença de determinadas substâncias responsáveis por interferir com a amplificação do mesmo. Após uma otimização foi determinada a concentração ideal de amostra, bem como a quantidade de *template* necessário para a obtenção dos melhores resultados em ambos os protocolos de *nested*-PCR.

Assim, para o protocolo de *nested*-PCR com *primers* universais (A e B) que amplificam DNA de espiroquetas do Género *Leptospira*, provenientes do gene *rrs* (16S) o DNA extraído dos órgãos de roedores foi submetido a uma diluição de 1/2, utilizando-se apenas 2µL de *template* na 1ª reação, sendo a 2ª reação igual ao protocolo utilizado para a amplificação das amostras de água e solo. No caso das amostras de sangue e urina, não houve diluição prévia das amostras, no entanto, utilizaram-se 2µL de *template* na 1ª reação e 2µL de *template* na 2ª reação.

2.8.4.2 - *Nested-PCR* com *primers* específicos “LipL32”

À semelhança da amplificação de água e solo, nas amostras de órgãos, sangue e urina onde se verificou amplificação de DNA leptospírico com os *primers* universais (A e B), foram de seguida submetidas a um novo protocolo de *nested-PCR*, no qual foram utilizados *primers* específicos para as espécies patogénicas de *Leptospira*, procedendo-se igualmente a uma otimização que permitisse a obtenção de melhores resultados na amplificação de DNA. Desta forma, o DNA extraído dos órgãos de roedores foi previamente diluído a 1/4, utilizando-se na 1ª reação do protocolo de *nested-PCR* um *template* de 5µL. No caso DNA proveniente das amostras de sangue e urina, não houve diluição prévia, no entanto, apenas foi utilizado 5µL de *template* na 1ª reação do *nested-PCR*, sendo a 2ª reação igual ao protocolo utilizado para a amplificação das amostras de água e solo.

Os produtos resultantes da amplificação de DNA dos dois protocolos foram igualmente sujeitos a electroforese, utilizando-se os mesmos procedimentos e condições descritos anteriormente. Os géis obtidos foram posteriormente observados sob UV.

2.9 - Cultura de tecido renal em meio seletivo EMJH

De forma a procurar isolar as leptospiros presentes nos rins dos roedores capturados, foi efetuada de forma aleatória a cultura de alguns rins. Aquando da necrópsia dos roedores, um dos rins extraídos era colocado num tubo *Falcon*® contendo meio de cultura seletivo EMJH, o qual era imediatamente refrigerado. Após o transporte para o laboratório, o protocolo para a cultura de rins era iniciado, num período de tempo não superior a 6h.

Numa câmara de fluxo laminar e na presença de um bico de Bunsen (de forma a manter o ambiente estéril), iniciou-se o procedimento, com a colocação do rim num saco *Stomacher*® contendo 10mL (se se tratava de murganhos) ou 20mL (para ratos) de *Leptospira Enrichement EMJH* (BD Difco™). O rim foi de seguida macerado com o auxílio de uma vareta de vidro, e o *Stomacher*® colocado numa caixa (Fig. 2.13), em posição vertical e ao abrigo da luz, durante duas horas. Este período de tempo de repouso, permite que as leptospiros migrem para a superfície do meio, tendo sido retirado 1mL de sobrenadante para um tubo de EMJH líquido (3,5mL), o qual foi designado de (-1).



Figura 2.13 – Tecido renal de roedor colocado em saco *Stomacher*®. (Fotografia original do autor)

O tubo (-1) foi de seguida agitado, procedendo-se a uma segunda diluição. Para esta diluição retirou-se 1mL do tubo (-1) para um novo tubo contendo EMJH líquido (3,5mL), o qual foi denominado (-2). Os dois tubos foram de seguida colocados em repouso ao abrigo da luz durante uma hora.

Passado esse tempo, o tubo (-2) foi agitado e realizou-se a sementeira para dois tubos contendo EMJH semissólido. Num dos tubos foram colocadas 6 a 8 gotas provenientes do tubo (-2) e no outro foram colocadas 10 a 12 gotas do tubo (-2). Ao primeiro tubo foi atribuída a letra A e ao segundo a letra B, como nomenclatura das diluições efetuadas.

Ambos os tubos com meio EMJH semissólido, A e B, foram de seguida incubados a 29°C numa incubadora orbital que os manteve em agitação permanente a 80rpm 24h/24h. As culturas foram verificadas no dia seguinte e daí em diante foram observadas de dois em dois dias, de forma a confirmar a ausência de contaminação e acompanhar o desenvolvimento das culturas.

2.10 - Sequenciação do DNA de *Leptospira* spp.

As amostras em que se obteve amplificação de DNA no protocolo de *nested*-PCR, utilizando-se o protocolo “LipL32”, foram enviadas para sequenciação, de forma a entender-se quais as espécies patogénicas de *Leptospira* responsáveis pela contaminação das coleções de água e solos recolhidos, bem como pela colonização dos roedores capturados.

Desta forma, de entre as amostras com amplificação de DNA de leptospiros patogénicas, foram enviadas para sequenciação à empresa *GATC Biotech AG*, na Alemanha, algumas amostras representativas das regiões em estudo. As amostras sequenciadas foram previamente preparadas, adicionando-se 5µL de *template* (produto do *nested-PCR* com os *primers* “LipL32” e 5µL do *primer* LipL32 *forward*.

Os resultados da sequenciação foram analisados no programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), comparando-se cada sequência obtida com as existentes no *GenBank*[®].

2.11 - Análise de resultados

Com os dados recolhidos, quer na componente de campo quer na componente laboratorial, foi construída uma base de dados no programa Microsoft Excel 2016, ajudando posteriormente à escolha dos testes para o respetivo tratamento e análise estatística. Este mesmo programa foi utilizado para a realização da estatística descritiva.

Foi utilizado também o programa de análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) onde foi realizado o teste Qui-quadrado (χ^2) para comparar variáveis qualitativas, adotando-se o nível de significância de 0,05 ($P < 0,05$), sempre que necessário, utilizou-se o teste exato de Fisher.

Foi também utilizado o programa CLC Genomics Workbench 12 (Free Trial) para a análise dos resultados obtidos por sequenciação.

III - RESULTADOS

3.1 - Sensibilidade e especificidade dos protocolos de *nested*-PCR

Após a realização dos testes de sensibilidade e de especificidade com os dois protocolos de PCR anteriormente descritos, utilizando *primers* específicos “LipL32”, verificou-se a amplificação das amostras correspondentes a diluições contendo DNA leptospírico sensível até a uma concentração de 10^2 (poço 6), sendo que as amostras com DNA de *Borrelia burgdorferi* s.l. e *L. biflexa* (Patoc), não foram amplificadas, como se observa na Figura 3.1.

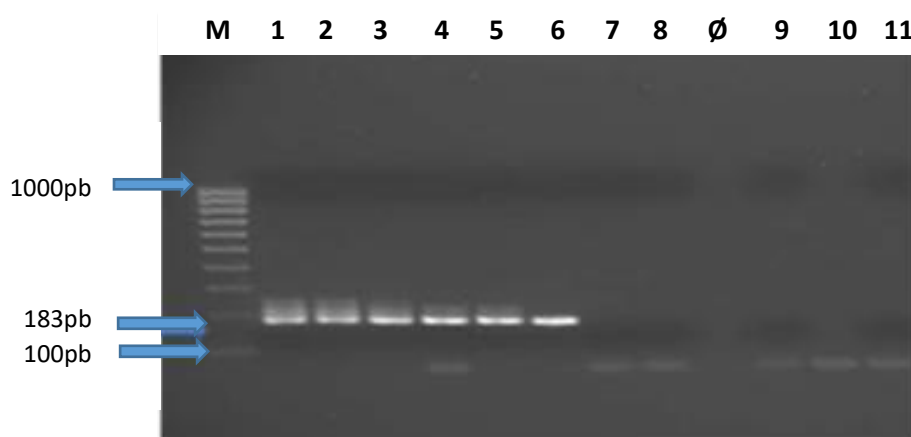


Figura 3.1 - Representação da sensibilidade e especificidade da técnica de *nested*-PCR para amplificação de DNA com os *primers* “LipL32” de uma estirpe de *L. interrogans*: 1 a 8 – RGA (10^7 a 1 bact/ml); 9 – Controlo Negativo; 10 – *Borrelia burgdorferi* s.l. 11 – *L. biflexa* (Patoc); M – Marcador molecular.

3.2. Amostras de água

3.2.1 – Coleções de água

Para a realização deste estudo foi analisado um total de (N=327) mostras de água, das quais 164 pertencem ao distrito de Lisboa, enquanto as restantes 163 amostras pertencem ao distrito de Setúbal, como é possível observar no Quadro 3.

Quadro 3 – Representação do número de amostras recolhidas nos diferentes concelhos dos dois Distritos estudados.

		Concelhos										Total
		Lis	Sin	Maf	T.Ved	Set	Alm	Mon	Alc	A.Sal	S.Cac	
Distritos	Lisboa	74	48	30	12							164
	Setúbal					36	54	10	20	38	5	163
	Total	74	48	30	12	36	54	10	20	38	5	327

Legenda: “Lis” – Lisboa; “Sin” – Sintra; “Maf” – Mafra; “T.Ved” – Torres Vedras; “Set”- Setúbal; “Alm” – Almada; “Mon” – Montijo; “Alc” – Alcochete; “A.Sal” – Alcácer do Sal; “S. Cac” – Santiago do Cacém

3.2.2 - Parâmetros físico-químicos

Como referido no ponto **1.4.1** da secção **Materiais e Métodos**, foram registados os resultados dos parâmetros físico-químicos das coleções de água onde se efetuaram colheitas, logo após a recolha das mesmas de modo a evitar possíveis alterações.

Os valores da temperatura da água que foram registados situaram-se entre os 9,4°C e 21°C, enquanto que os valores da temperatura do ar oscilaram entre os 11°C e 19°C.

Nos distritos de Lisboa e Setúbal o valor do pH foi maioritariamente de 7, com percentagens de 65% e 81%, respetivamente (Fig. 3.2). No total das 327 amostras analisadas, ($n_{\text{água}}=238$; 73%) o valor de pH foi de 7, sendo que os restantes 27% corresponderam a valores de pH de 5, 6 e 8, como se observa na Figura 3.3.

Valor de pH das amostras de água nos diferentes locais dos distritos de Lisboa e Setúbal

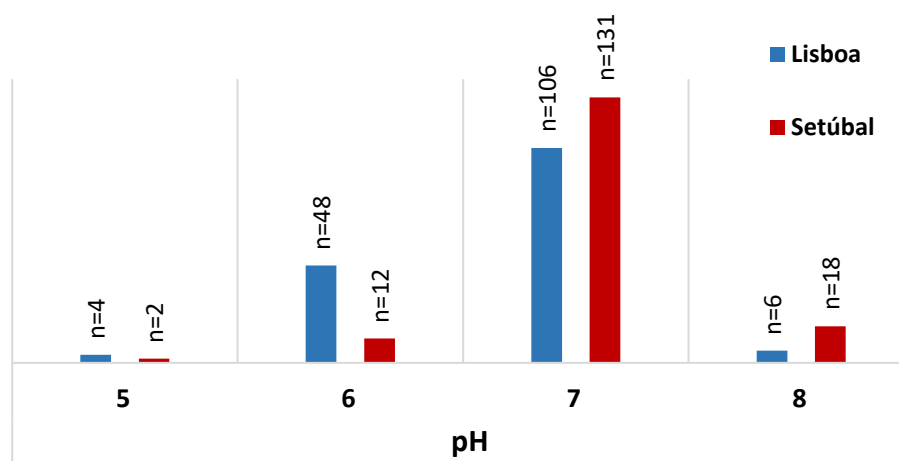
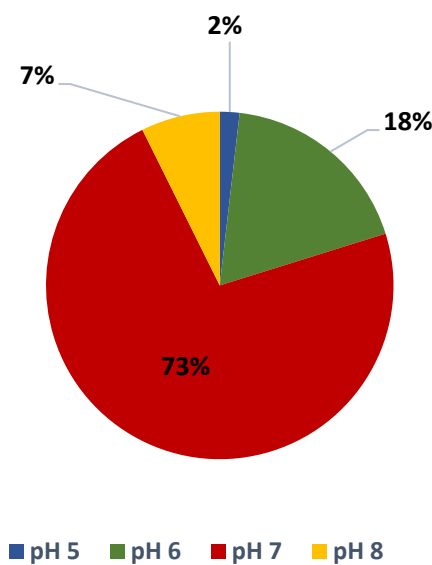


Figura 3.2 – Representação gráfica do total de amostras (N=327) *versus* o valor de pH registado nas coleções de água avaliadas nos dois distritos (Lisboa e Setúbal).

Amostragem total

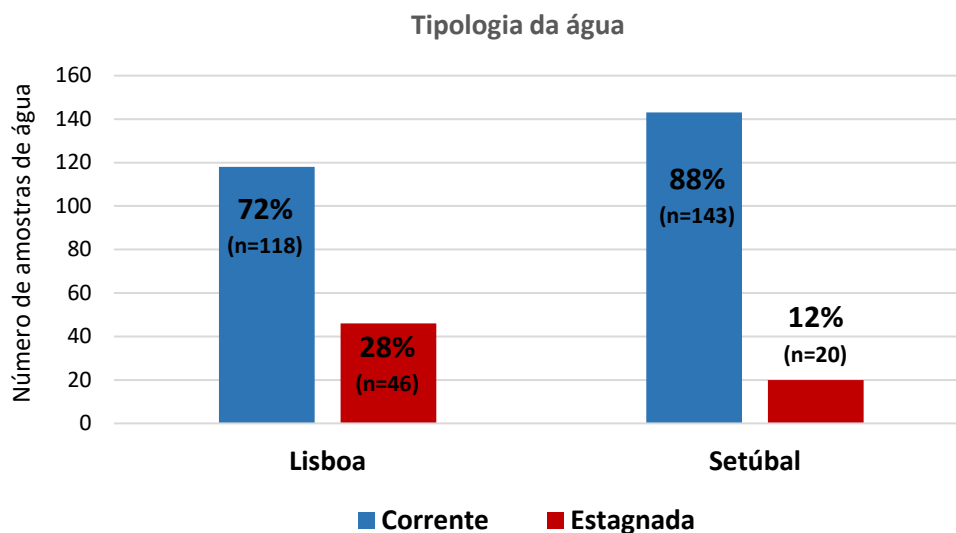
$N_{\text{água}} = 327$



Figuras 3.3 - Representação gráfica da percentagem de amostras de água de acordo com o valor de pH, considerando o total de amostras (N=327).

Quanto à análise de nitritos, todas as amostras foram analisadas na altura da colheita e apresentaram resultados inferiores a 0,1 mg/ml NO_2 .

No tipo de água recolhida, verificou-se que 80% (n=261) amostras correspondem a água corrente e os restantes 20% (n=66) foram classificadas como água estagnada. No distrito de Lisboa e Setúbal, as tipologias de água mais observadas foram de água corrente (Fig. 3.4).



Figuras 3.4 - Representação gráfica da percentagem de água das amostras recolhidas de acordo com a sua tipologia e respetivo distrito.

3.2.3 - Amplificação de DNA leptospírico com *primers* universais (A e B)

Após a extração de DNA, as 327 amostras foram submetidas a um protocolo de *nested*-PCR com utilizando *primers* universais (A e B) (Fig. 3.5).

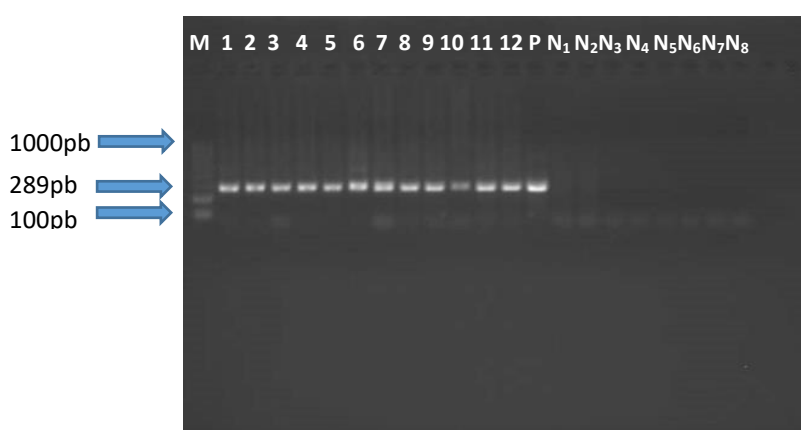


Figura 3.5 - Observação de um gel de eletroforese de amostras de água após amplificação por *nested*-PCR com *primers* universais (A e B). (M – Marcador molecular (100pb); 1 a 12 – amostras de água; P – controlo positivo; N₁ a N₄- controlo negativo da extração; N₅ a N₈ – controlo negativo da PCR)

No total de amostras analisadas (N=327), 49% apresentaram amplificação de DNA leptospírico enquanto que em 51% (n_{água}=168) não se observou amplificação de *Leptospira* spp. amplificadas (Fig. 3.6)

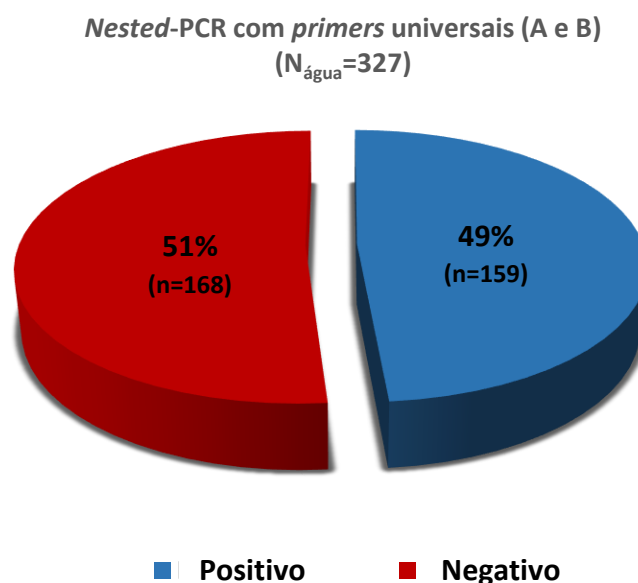


Figura 3.6 – Representação gráfica das amostras de água onde se observou amplificação de DNA de *Leptospira* spp., pela *nested*-PCR com *primers* universais (A e B) versus as amostras onde não foi detetado DNA da referida bactéria.

Das 164 amostras analisadas do distrito de Lisboa, verificou-se amplificação DNA de *Leptospira* spp., com *primers* universais em 106 amostras, o que corresponde a uma percentagem de 65%. Das 163 amostras analisadas do distrito de Setúbal verificou-se amplificação em 53 amostras (33%) sendo as restantes amostras negativas (Fig. 3.7).

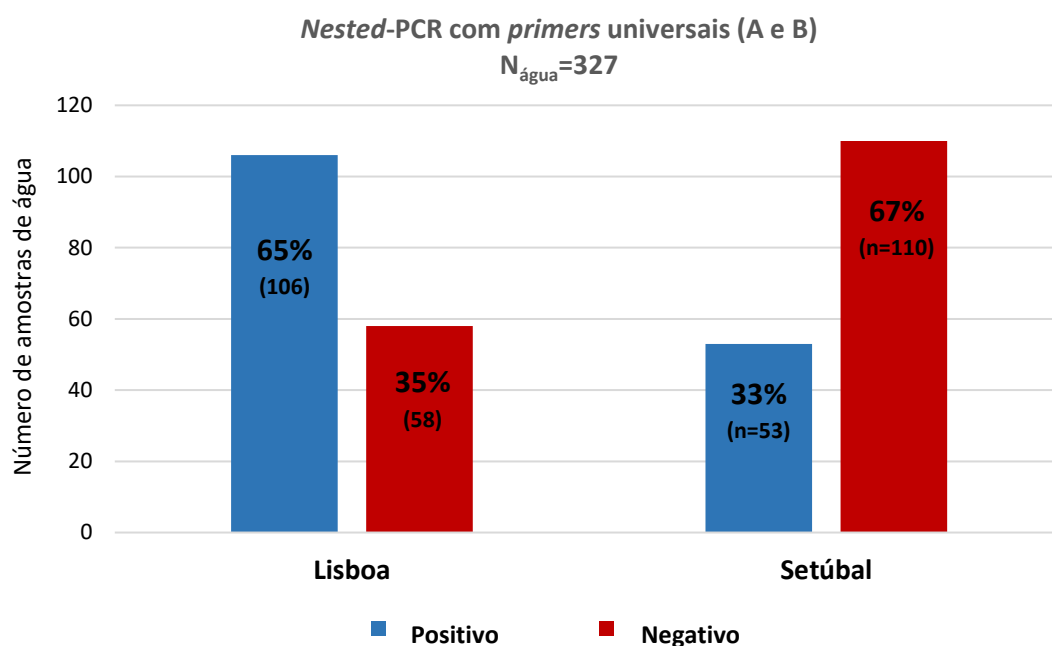


Figura 3.7 – Representação gráfica dos resultados obtidos nas amostras que foram submetidas ao protocolo de *nested*-PCR com *primers* universais (A e B) referentes aos dois distritos (Lisboa e Setúbal).

3.2.4– Amplificação de DNA leptospírico com *primers* específicos “LipL32”

Foram utilizadas as amostras em que houve amplificação de DNA leptospírico (N=159) num segundo protocolo de *nested*-PCR, desta vez com *primers* específicos “LipL32” (Fig. 3.8).

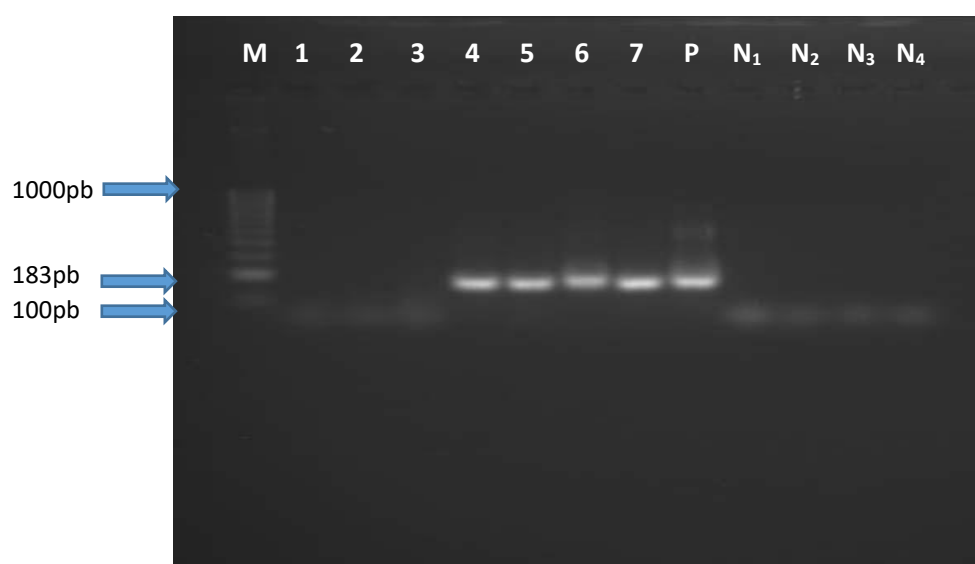


Figura 3.8 - Observação de um gel de eletroforese de amostras de água após amplificação por *nested*-PCR com *primers* específicos “LipL32”. (M – Marcador molecular; 1 a 6 – amostras de água; P – controlo positivo; de N₁ a N₄ – controlo negativo da PCR)

Das 159 amostras analisadas, 55 (35%) apresentaram amplificação de DNA leptospírico correspondendo a leptospiros patogénicas, enquanto que em 104 das mesmas não se obteve amplificação (65%) (Fig. 3.9).

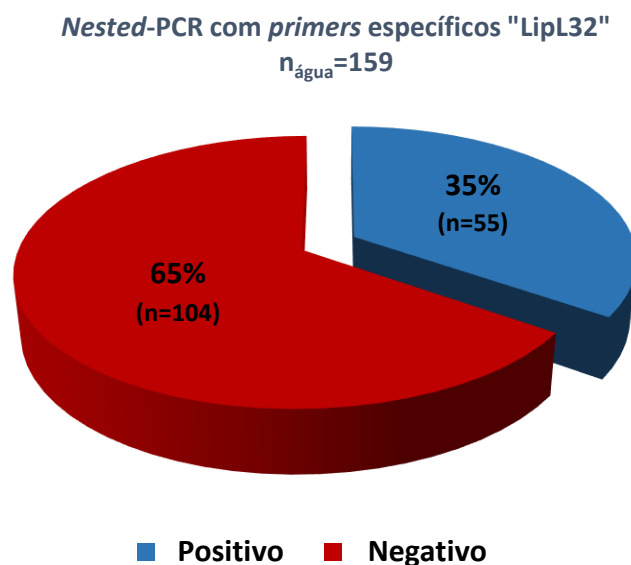


Figura 3.9 – Representação gráfica dos resultados totais da amplificação de DNA de *Leptospira* spp., nas amostras de água avaliadas pela *nested-PCR* com *primers* específicos “LipL32”.

Das 106 amostras do distrito de Lisboa, onde se observou a amplificação de DNA de *Leptospira* spp. com *primers* universais, obteve-se amplificação de DNA de leptospiros patogénicas em 28 amostras (26%), não tendo sido amplificado DNA nas restantes 78 amostras (74%) (Fig. 3.10). No que respeita à mostragem do distrito de Setúbal foram avaliadas 53 amostras, tendo-se verificado amplificação de DNA de leptospiros patogénicas em 51% sendo as restantes 26 amostras negativas (49%), como se observa na (Fig. 3.11).

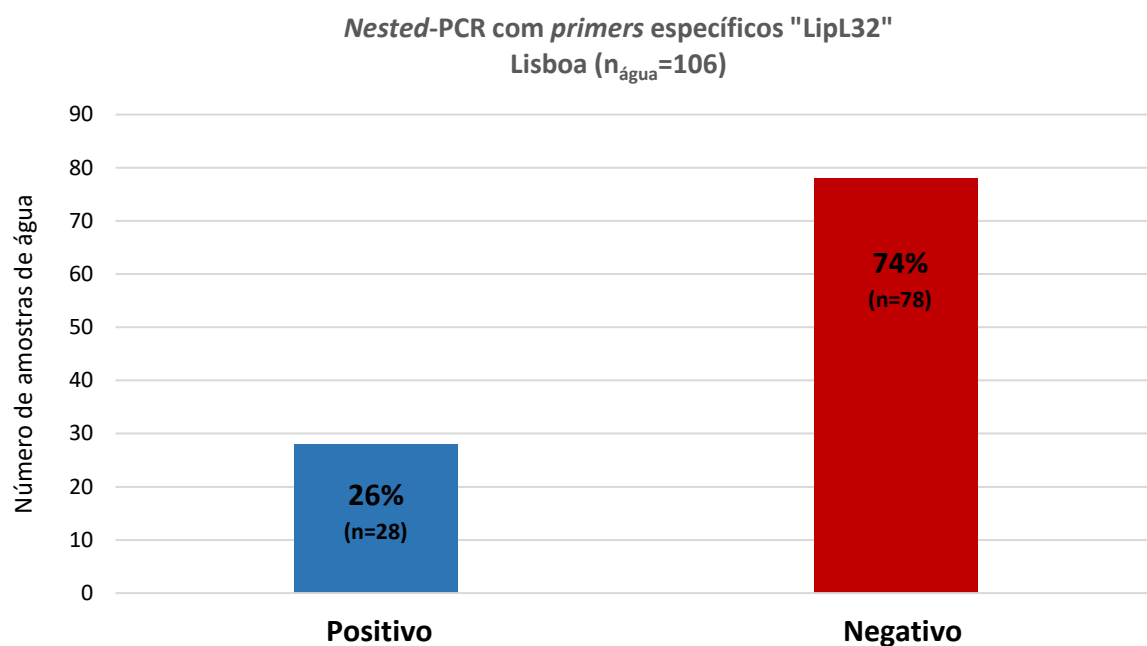


Figura 3.10 – Representação gráfica dos resultados das amostras provenientes do distrito de Lisboa que foram avaliadas pela *nested*-PCR com *primers* específicos “LipL32”.

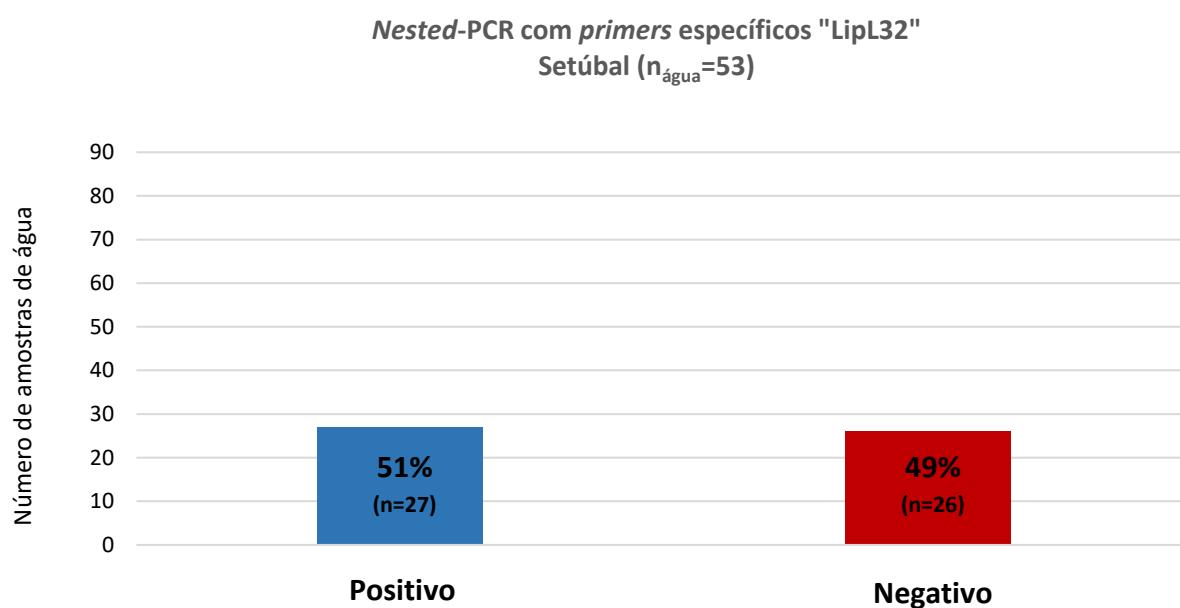


Figura 3.11 – Representação gráfica dos resultados das amostras do Distrito de Setúbal que foram submetidas ao protocolo de *nested*-PCR com *primers* específicos “LipL32”.

Quadro 4 – Resumo dos resultados obtidos nos dois diferentes protocolos de *nested*-PCR para as amostras de água.

	<i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais A e B		<i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32”	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Lisboa	106	58	28	78
Setúbal	53	110	27	26
Total	159	168	55	104

3.2.5 – Tratamento estatístico

Foi efetuado o teste Qui-quadrado para determinar a associação entre os valores de pH registados e a presença ou ausência de espiroquetas do género *Leptospira*, o qual não foi validado pois os critérios para a sua aplicação não existiam, desta forma realizou-se o teste exato de Fisher onde se obteve um valor de $p=0,000$ que indica a existência de associação entre as variáveis.

O mesmo teste foi aplicado para determinar a associação entre a tipologia da água e a presença ou ausência de *Leptospira spp.*, no qual se obteve o valor de $p=0,000$ como é possível observar na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados do teste Qui-Quadrado entre a tipologia da água e a presença ou ausência de *Leptospira spp.*

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)
Qui-quadrado de Pearson	371,729 ^a	4	,000
Razão de verossimilhança	270,822	4	,000
N de Casos Válidos	371		

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 5,22.

3.3 - Amostras de solo

3.3.1 – Coleções de Solos

Foi também analisado um total de 96 amostras de solos, das quais 42 são provenientes do distrito de Lisboa enquanto as restantes 54 amostras foram obtidas no distrito de Setúbal, como ilustrado no Quadro 4.

Quadro 5 - Distribuição do número de amostras recolhidas nos diferentes concelhos dos dois distritos estudados.

		Concelhos												Total
		Lis	Sin	Maf	V.F.X	T.Ved	Set	Alm	Mon	Alc	Grân	A.Sal	S.Cac	
Distritos	Lisboa	10	10	10	9	3								42
	Setúbal						9	9	2	7	6	10	11	54
	Total	10	10	10	9	3	9	9	2	7	6	10	11	96

Legenda: “Lis” – Lisboa; “Sin” – Sintra; “Maf” – Mafra; “V.F.X” – Vila Franca de Xira; “T.Ved” – Torres Vedras; “Set” – Setúbal; “Alm” – Almada; “Mon” – Montijo; “Alc” – Alcochete; “Grân” – Grândola; “A.Sal” – Alcácer do Sal; “S.Cac” – Santiago do Cacém.

3.3.2 - Parâmetros físico-químicos

À semelhança do que foi feito para as amostras de água, foram anotados os resultados dos parâmetros físico-químicos dos solos, imediatamente após se efetuar a recolha dos mesmos, de modo a evitar possíveis alterações nos valores dos respetivos parâmetros em apreço.

A temperatura do solo que foi registada variou entre os 12,5°C e 25,8°C, tendo a temperatura do ar registado uma variação entre os 13° e os 23°C.

Como é possível verificar na Figura 3.12, o valor de pH foi predominantemente 7, nas amostras de solo obtidas nos distritos de Lisboa e Setúbal, com percentagens de 81% e 85%, respetivamente. Na totalidade das 96 amostras analisadas, 83% apresentaram um valor de pH igual a 7, sendo que os restantes 17% tinham valores de pH de 6 e 8, como documentado na Figura 3.13.

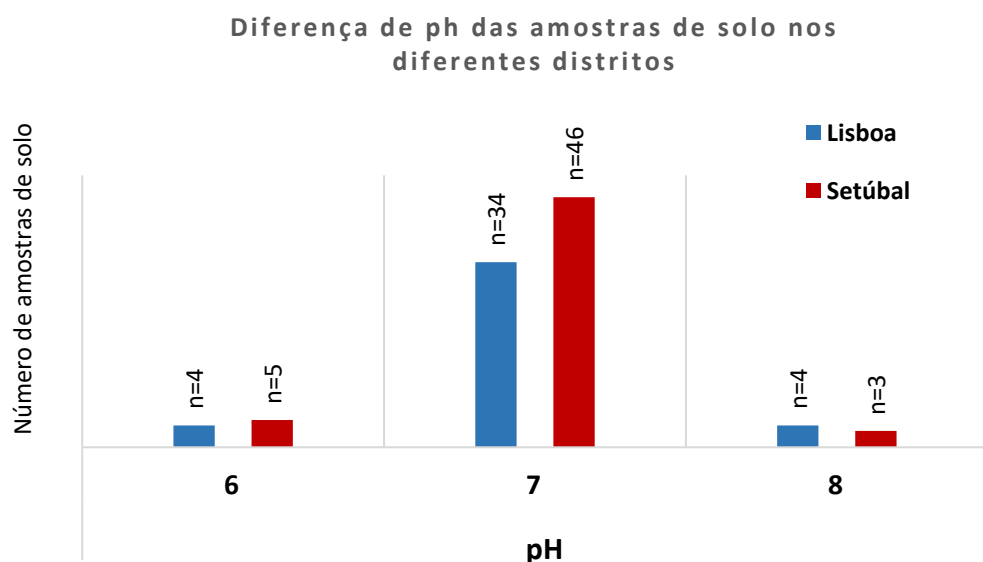


Figura 3.12 – Representação gráfica do total de amostras de solo ($N_{\text{solo}}=96$) *versus* o valor de pH registado de acordo com o distrito de proveniência.

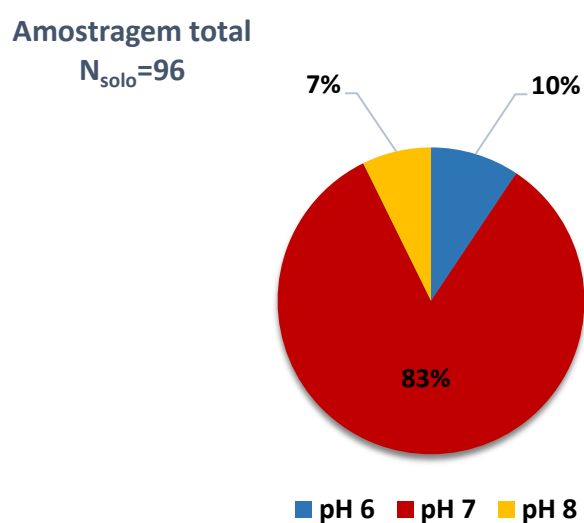


Figura 3.13 – Representação gráfica da distribuição percentual de amostras de solo de acordo com o valor de pH, no total de amostras ($N_{\text{solo}}=96$).

Ao analisar o nível de humidade do solo recolhido de uma forma qualitativa, de acordo com a notação indicada em Material e Métodos, verificou-se que, no distrito de Lisboa, o nível 2 de humidade foi o mais predominante, com uma percentagem de 40%, seguido pelo nível 1 (21%), nível 3 (19%) e nível 4 e 5 com 10% cada. No distrito de Setúbal, o nível 2 de humidade foi também o mais predominante (37%) seguido pelo nível 4 (24%), nível 3 (22%), nível 5 (9%) e nível 1 com uma percentagem de 8% (Fig. 3.14).

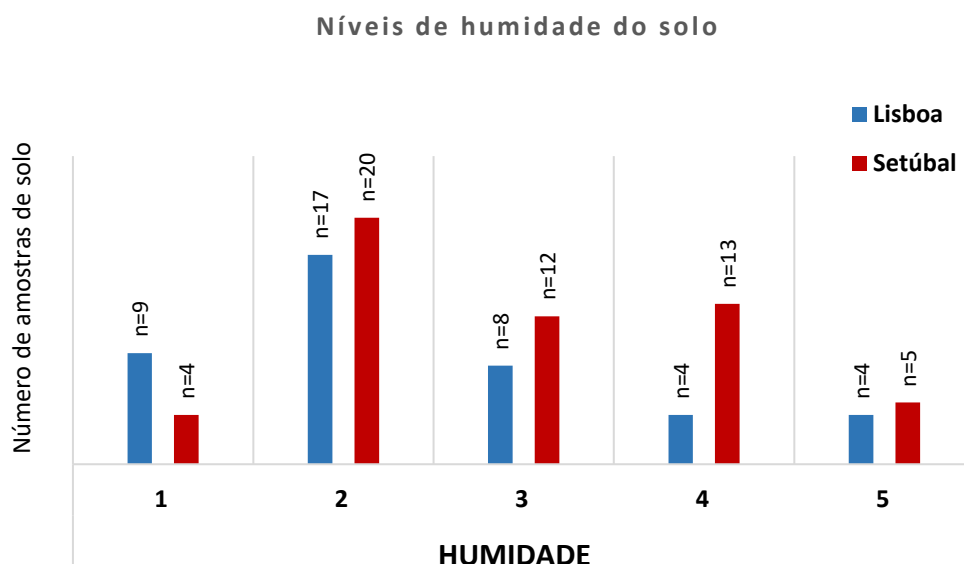


Figura 3.14 – Representação gráfica do nível de humidade registado nas amostras de solo por distrito e de acordo com a seguinte notação: 1 – seco; 2 - pouco húmido; 3 – húmido; 4 – muito húmido; 5- molhado.

Em relação ao nível de humidade no total de amostras recolhidas, o nível 2 foi o mais predominante (38%), seguido pelo nível 3, nível 4, nível 1 e nível 5, como se pode constatar na Figura 3.15.

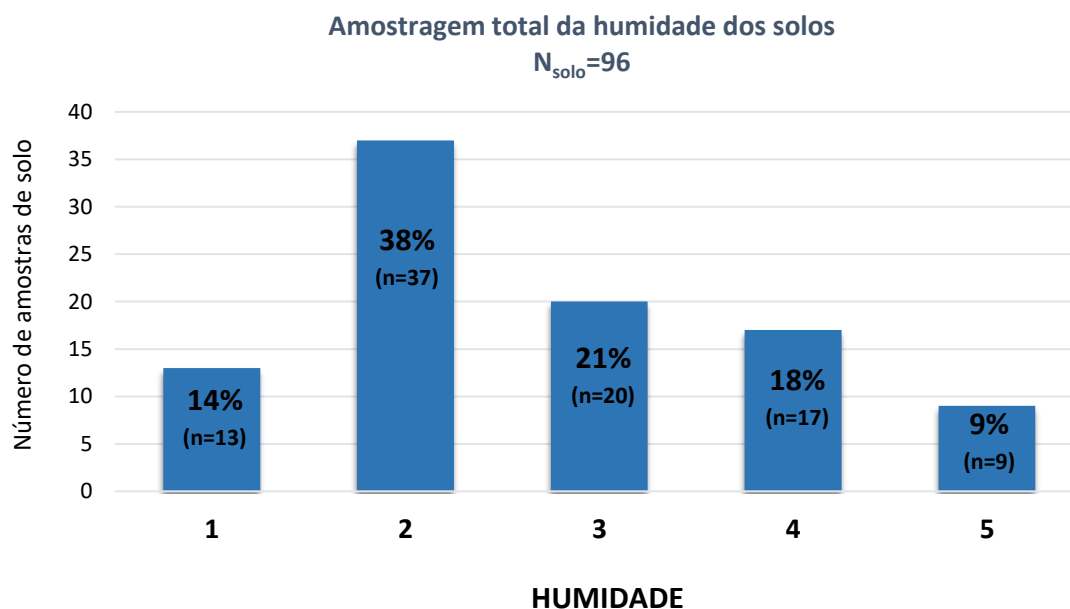


Figura 3.15 – Representação gráfica da distribuição do total de amostras por nível de humidade registado nas amostras de acordo com a notação adotada: 1 – seco; 2 - pouco húmido; 3 – húmido; 4 – muito húmido; 5- molhado.

Quanto à análise da dimensão dos grânulos, todas as amostras apresentaram resultados de grânulos predominantemente inferiores a 1mm.

3.3.3 - Amplificação de DNA leptospírico com *primers* universais (A e B)

Tal como efetuado para as amostras de água, pós a extração de DNA, o total de amostras de solo ($N_{\text{solo}}=96$) foi submetido ao protocolo de *nested*-PCR com *primers* universais (A e B) e os produtos obtidos foram separados por eletroforese para análise dos resultados (Fig. 3.16).

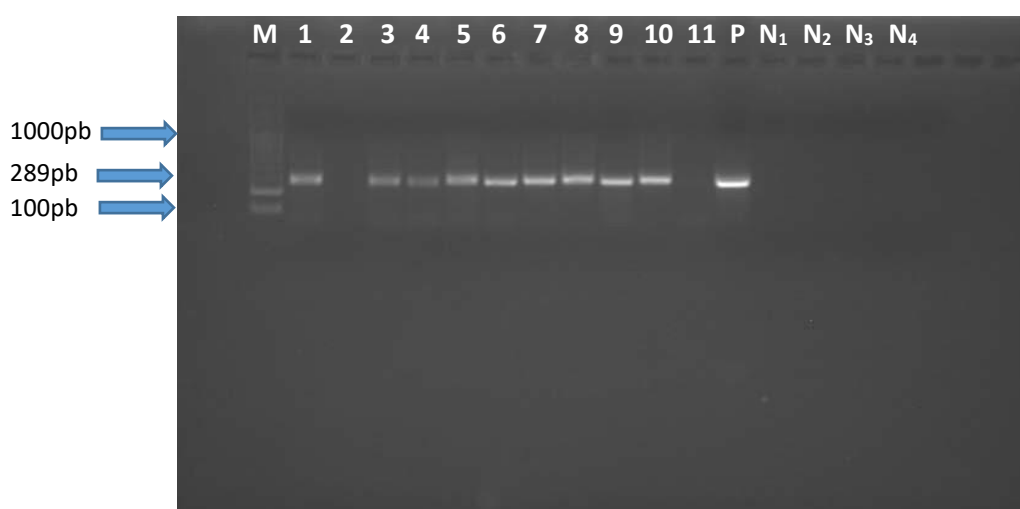


Figura 3.16 – Observação de um gel de eletroforese de amostras de solo após amplificação por *nested*-PCR com *primers* universais (A e B). (M – Marcador molecular; 1 a 11 – amostras de solo; P – controlo positivo; N- controlo negativo do PCR)

Das 96 amostras analisadas, 80 (83%) apresentaram amplificação de DNA leptospírico, enquanto que em 16 amostras não se observou amplificação (17%) (Fig. 3.17).

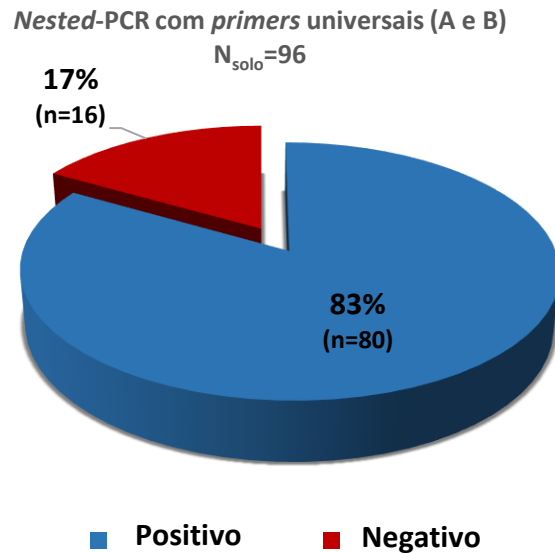


Figura 3.17 – Representação gráfica dos resultados das amostras de solo de acordo com a amplificação de DNA de *Leptospira spp.* obtidos, após análise da *nested-PCR* com *primers* universais (A e B).

No que respeita à análise molecular das amostras obtidas nos diversos concelhos do distrito de Lisboa (n_{solo}=42), verificou-se amplificação DNA de espiroquetas do género *Lepstospira* com *primers* universais em 83% (Fig. 3.18). Quanto às amostras provenientes do distrito de Setúbal (n_{solo}=54) analisadas nas mesmas condições, verificou-se amplificação de DNA em 83% das amostras, sendo as restantes amostras negativas (Fig. 3.19).

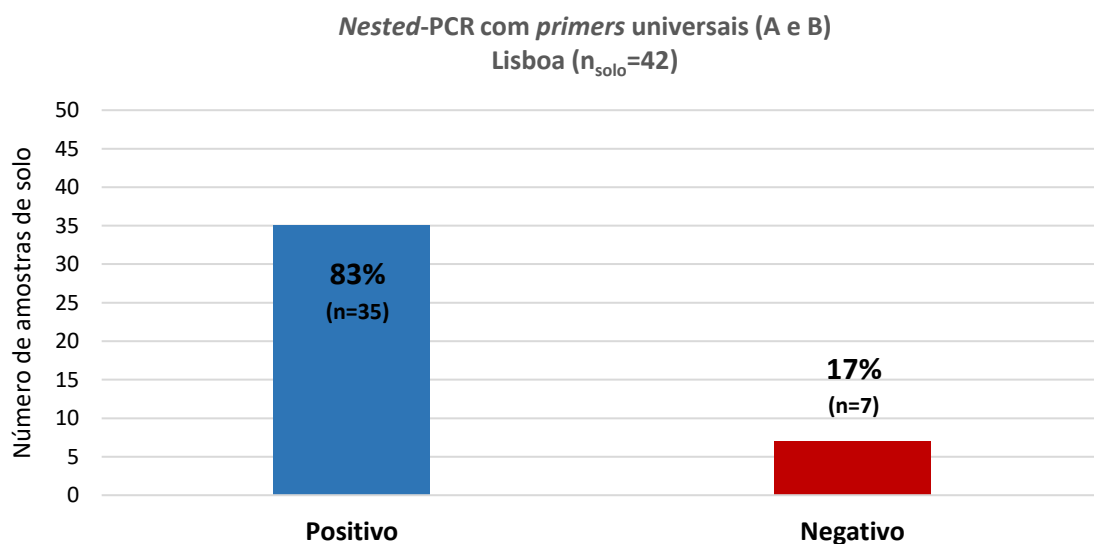


Figura 3.18 – Representação gráfica dos resultados obtidos por amplificação de DNA leptospírico nas amostras de solo no distrito de Lisboa, analisadas pela *nested-PCR* com *primers* universais (A e B).

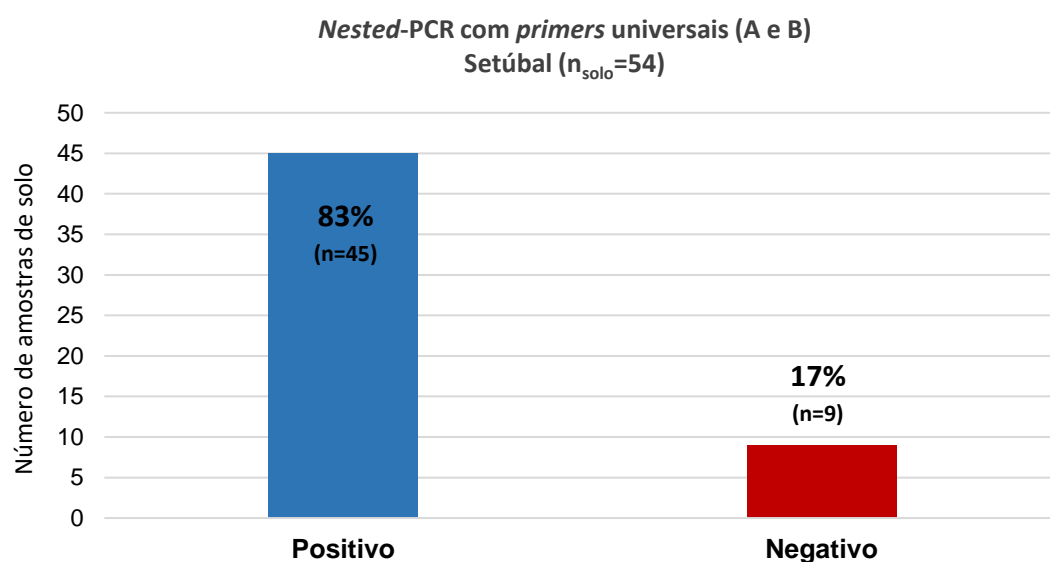


Figura 3.19 – Representação gráfica dos resultados obtidos por amplificação de DNA leptospírico nas amostras de solo no distrito de Setúbal, analisadas pela *nested*-PCR com *primers* universais (A e B).

3.3.4 - Amplificação de DNA leptospírico com *primers* específicos “LipL32”

Para o outro protocolo de *nested*-PCR com *primers* específicos “LipL32” foram utilizadas as amostras em que houve amplificação de DNA leptospírico com *primers* universais (A e B) ($n=80$). Após a eletroforese os resultados são os que a Figura 3.20 documenta.



Figura 3.20 - Observação de um gel de eletroforese com amostras de solo após amplificação por *nested*-PCR com *primers* específicos “LipL32”. (M – Marcador molecular; 1 a 8 – amostras de solo; P – controlo positivo; N – controlo negativo do PCR)

Das 80 amostras analisadas, sete (9%) mostraram presença de DNA leptospírico correspondendo a leptospiros patogénicas, enquanto que em 73 amostras não se obteve amplificação de DNA (91%) (Fig. 3.21).

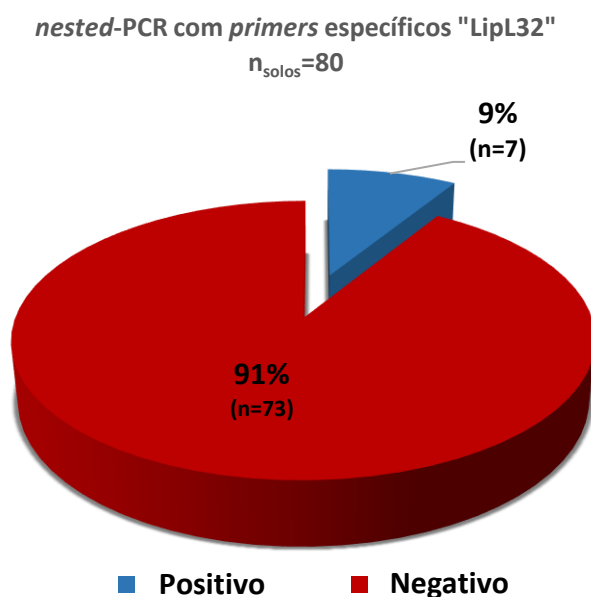


Figura 3.21 – Representação gráfica dos resultados totais, das amostras de solo, que foram analisadas pelo protocolo de *nested-PCR* com *primers* específicos “LipL32”.

Assim, analisando agora os resultados por distrito, verificou-se que, no que respeita a Lisboa, das 35 amostras com presença de DNA de espiroquetas do género *Lepstospira* com *primers* universais, obteve-se amplificação de DNA de leptospiros patogénicas em três amostras (9%) (Fig. 3.22). Por sua vez, das amostras do distrito de Setúbal com prévia indicação de presença de DNA leptospírico ($n=45$), foi detetado DNA de leptospiros patogénicas em quatro dessas amostras (9%), como documentado na Figura 3.23.

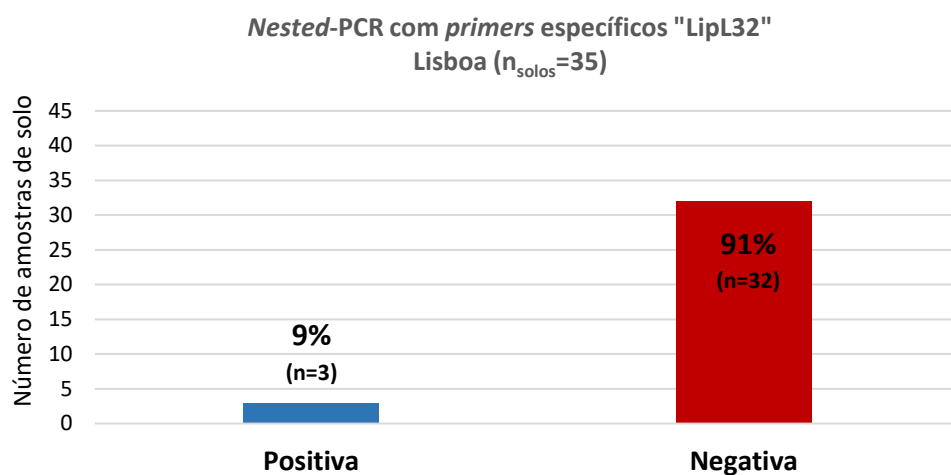


Figura 3.22 – Representação gráfica da deteção de DNA para espécies patogénicas de *Leptospira*, obtidos nas amostras (distritos de Lisboa e Setúbal) após análise pela *nested*-PCR para “LipL32”.

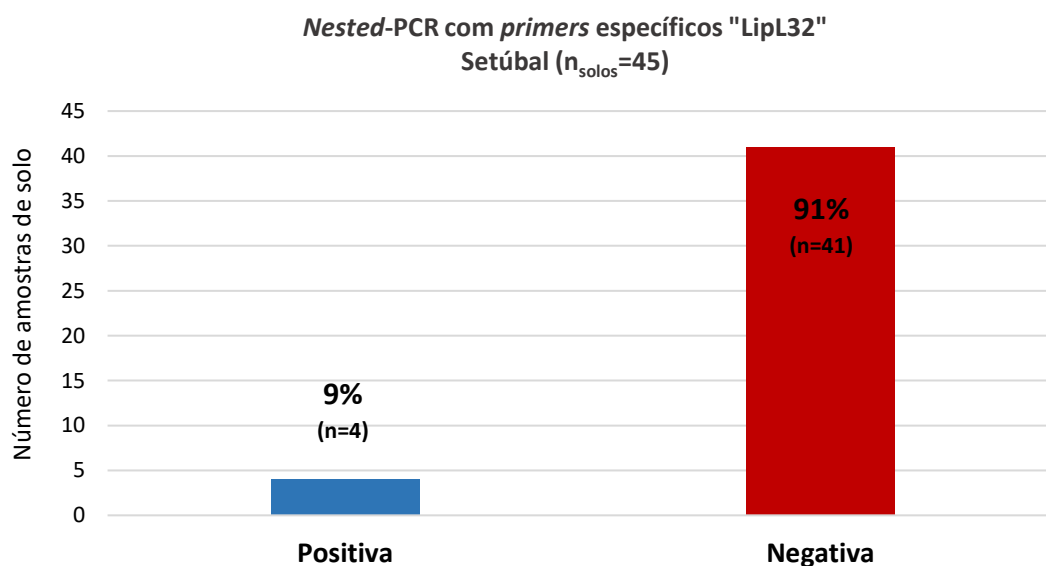


Figura 3.23 – Representação gráfica da deteção de DNA para espécies patogénicas de *Leptospira*, obtidos nas amostras (distritos de Lisboa e Setúbal) após análise pela *nested*-PCR para “LipL32”.

Quadro 6 – Resumo dos resultados obtidos nos diferentes *nested*-PCR para as amostras de solo.

	<i>nested</i> -PCR com primers universais A e B		<i>nested</i> -PCR com primers específicos “LipL32”	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Lisboa	35	7	3	32
Setúbal	45	9	4	41
Total	80	16	7	73

3.3.5 – Tratamento estatístico

Tal como efetuado para as amostras de água, utilizou-se o teste Qui-quadrado para determinar a associação entre os valores de pH registados e a presença ou ausência de espiroquetas do género *Leptospira*, o qual não pode ser validado dado que os critérios para a sua aplicação não eram adequados, pelo que se aplicou o teste exato de Fisher, através do qual se obteve um valor de $p=0,000$ indicativo da existência de uma associação estatística entre as variáveis em estudo.

O mesmo teste (Fisher) foi aplicado para determinar se existia associação entre o nível de humidade do solo e a presença ou ausência de DNA leptospírico tendo sido obtido também um valor de $p=0,000$, demonstrativo da existência da referida associação.

3.4 – Amostras biológicas de roedores

3.4.1 – Captura de roedores

Para este estudo foi possível capturar 18 espécimes de roedores, dos quais nove foram capturados no distrito de Lisboa e os restantes no distrito de Setúbal (Quadro 5).

Quadro 7 – Distribuição do número de espécimes (roedores) capturados nos diferentes concelhos dos dois distritos estudados (Lisboa e Setúbal)

		Concelhos										Total
		Lis	Sin	Maf	T.Ved	Set	Alm	Mon	Alc	A.Sal	S.Cac	
Distritos	Lisboa	2	3	4	0							9
	Setúbal					0	2	4	2	0	1	9
	Total	2	3	4	0	0	2	4	2	0	1	18

Legenda: “Lis” – Lisboa; “Sin” – Sintra; “Maf” – Mafra; “T.Ved” – Torres Vedras; “Set” – Setúbal; “Alm” – Almada; “Mon” – Montijo; “Alc” – Alcochete; “A.Sal” – Alcácer do Sal; “S.Cac” – Santiago do Cacém.

Dos 18 espécimes, após identificação morfométrica verificou-se que 11 pertencerem à espécie *Mus musculus*, dos quais seis foram capturados no distrito de Lisboa e cinco no de Setúbal; os restantes sete foram identificados como representantes da espécie *Rattus norvegicus*, dos quais três foram capturados no distrito de Lisboa e quatro no de Setúbal (Fig. 3.24).

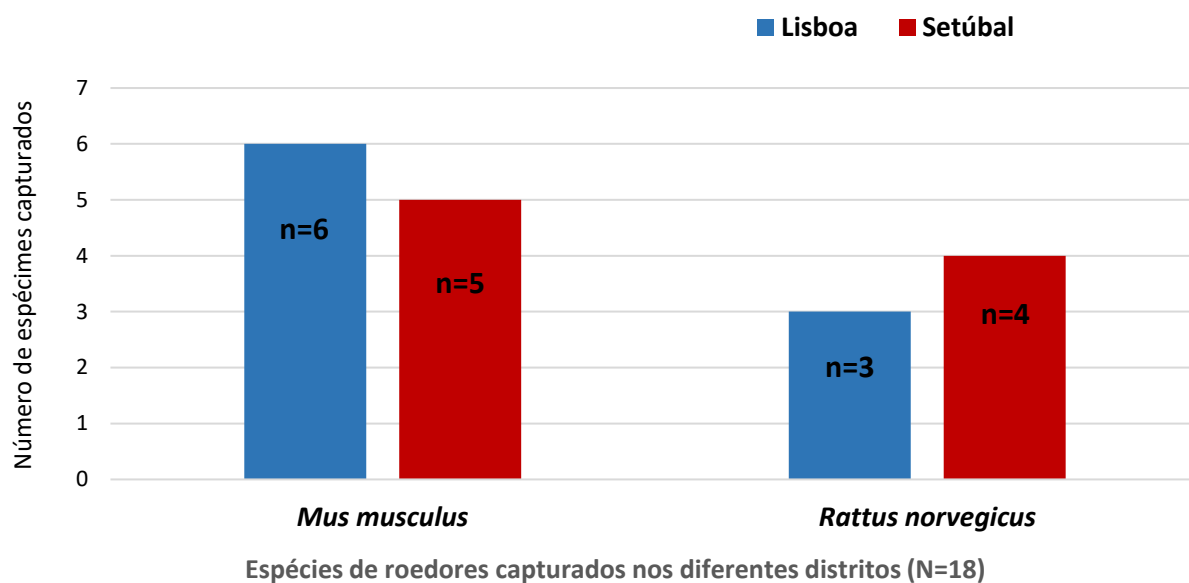


Figura 3.24 – Representação gráfica da distribuição dos espécimes (roedores) capturados por espécie e por distrito.

Como referido anteriormente no ponto 2.6.1 de **Material e Métodos**, os locais para colocar as armadilhas de captura dos roedores exigiam que se respeitassem alguns padrões de localização. Assim, após se efetivar a captura de cada espécime, foi sempre registado o tipo de periferia do local da captura (Fig. 3.25).

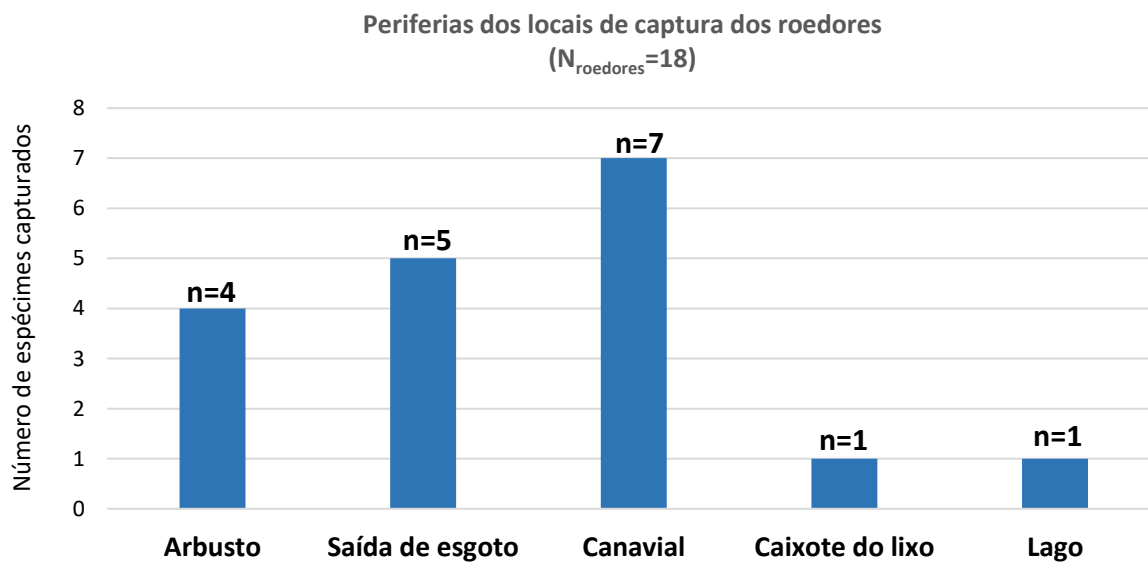


Figura 3.25 – Representação gráfica da distribuição de espécimes (roedores) capturados por local de captura.

3.4.2 - Parâmetros morfológicos dos roedores

Após a captura e eutanásia dos espécimes capturados, foi realizada a sexagem e registo de cada um dos mesmos, sendo que dos 18 roedores capturados, 16 (89%) eram machos e duas (11%) fêmeas, como é possível observar na distribuição representada na Fig. 3.26.

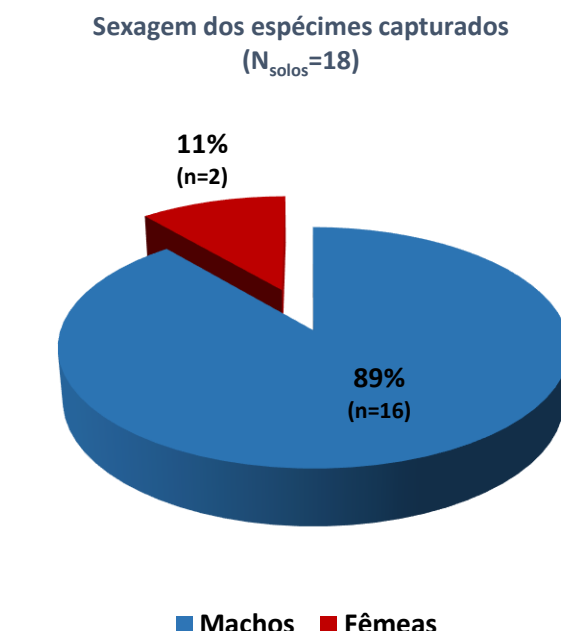


Figura 3.26 – Representação gráfica da distribuição dos roedores capturados por sexo.

Na altura da recolha das amostras biológicas, foram registados vários parâmetros morfológicos dos roedores, uma das características registadas foi a coloração do pelo, tendo todos apresentado uma coloração cinzento-acastanhada. O peso dos roedores da espécie *Mus musculus* situou-se entre 9g e 16g, tendo o peso dos roedores da espécie *Rattus norvegicus* oscilado entre 143g e 357g. Outras características morfológicas como o comprimento do corpo (incluindo a cauda), cauda, orelha, pata posterior esquerda, entre outras, foram registadas.

3.4.3 - Amostras biológicas recolhidas

Após a eutanásia de cada espécime, procedeu-se à recolha das amostras biológicas necessárias para este estudo. No total, foram recolhidas 139 amostras biológicas de órgãos (rim, pulmão, fígado e baço) bem como fluidos orgânicos (sangue e urina). Do total de amostras, 127 foram analisadas no âmbito molecular, visando a amplificação de DNA leptospírico, e nove (9) foram processadas para cultura em meio seletivo EMJH (Quadro 3), para possível isolamento de *Leptospira* spp..

Quadro 8 – Distribuição das amostras biológicas obtidas dos roedores capturados, por abordagem laboratorial e órgão/tecido processado

Amostras biológicas	Nº de amostras recolhidas (roedores)	Nº de amostras processadas por técnicas moleculares	Nº de amostras processadas para Cultura (EMJH)
Sangue	18	18	0
Urina	13	13	0
Baço	18	17	0
Rins	36	26	9
Fígado	18	18	0
Pulmões	36	15	0
Total	139	127	9

3.4.4 - Amplificação de DNA leptospírico com *primers* universais (A e B)

Tal como referido nos pontos **2.3** e **3.3** desta mesma Secção (**Resultados**) após a extração de DNA, 127 amostras foram avaliadas quanto à presença de DNA de espiroquetas do género *Leptospira*, pelo recurso ao protocolo de *nested*-PCR com *primers* universais (A e B); após a eletroforese foram observados e registados os respetivos resultados (Fig. 3.27).



Figura 3.27 - Observação de um gel de eletroforese de amostras biológicas após amplificação por *nested*-PCR com *primers* universais (A e B). (M – Marcador molecular; 1 a 12 – amostras biológicas; P – controlo positivo; N₁ a N₄- controlo negativo do PCR)

Das amostras analisadas, 44% apresentaram amplificação de DNA leptospírico, enquanto que em 71 amostras não se observou amplificação (56%) como demonstrado na Fig. 3.28.

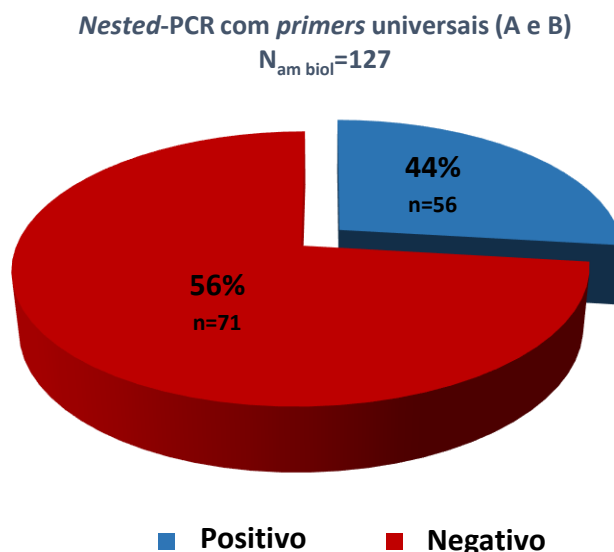


Figura 3.28 – Representação gráfica dos resultados obtidos nas amostras biológicas provenientes dos roedores, que foram processadas pela *nested*-PCR com *primers* universais (A e B).

Das 60 amostras analisadas do distrito de Lisboa, verificou-se amplificação de DNA de *Lepstospira* spp., com *primers* universais (A e B) em 38 das mesmas, o que corresponde a 63%. Quanto às amostras provenientes de roedores capturados no distrito de Setúbal (n=67) verificou-se amplificação em 27%, tendo as restantes amostras mostrado ausência de amplificação para espiroquetas do género *Leptospira* (Fig. 3.29).

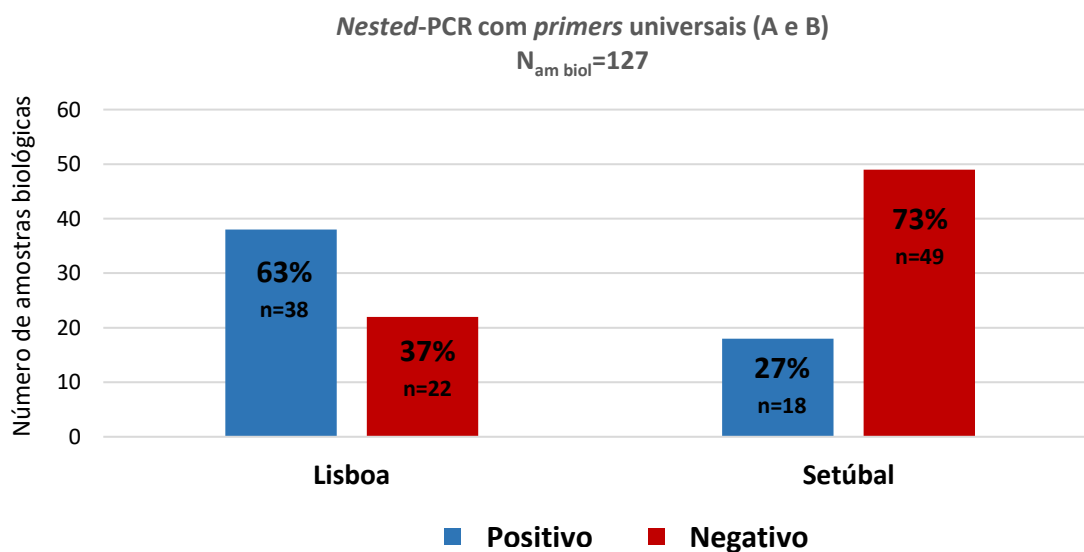


Figura 3.29 – Representação gráfica dos resultados das amostras biológicas (roedores) provenientes dos distritos (Lisboa e Setúbal) processadas pela *nested*-PCR com *primers* universais (A e B).

As amostras obtidas dos órgãos selecionados de cada roedor e avaliadas pelo mesmo protocolo de *nested-PCR* para detecção de DNA de espiroquetas do Género *Leptospira* permitiu construir o gráfico (Fig. 3.30) com os respetivos resultados.

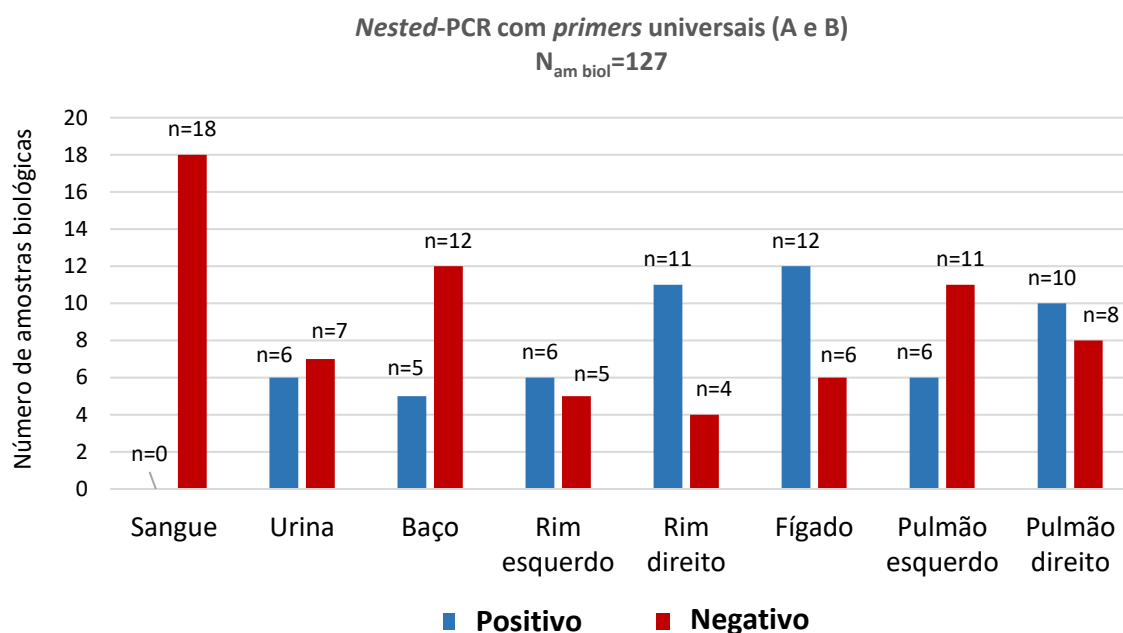


Figura 3.30 - Representação gráfica dos resultados obtidos pela *nested-PCR* com *primers* universais (A e B) nas amostras obtidas dos diferentes órgãos dos roedores.

3.4.5 - Amplificação de DNA leptospírico com *primers* específicos “LipL32”

À semelhança do que foi feito nos pontos 2.4 e 3.4 desta Secção, foram utilizadas as amostras em que houve prévia amplificação de DNA leptospírico (N=56) e processadas com um outro protocolo de *nested-PCR* agora com *primers* específicos “LipL32”, cujos resultados se documentam na Fig. 3.31.



Figura 3.31 - Observação de um gel de eletroforese de amostras biológicas, após amplificação por *nested-PCR* com *primers* específicos “LipL32”. (M – Marcador molecular; 1 a 15 – amostras biológicas; P – controlo positivo; N – controlo negativo do PCR).

Analisados os resultados verificou-se que das 56 amostras analisadas, em 44 das mesmas, os *primers* específicos para deteção de DNA de espécies patogénicas de *Leptospira* mostraram de forma inequívoca (79%) o carácter patogénico das referidas amostras (Fig. 3.32).

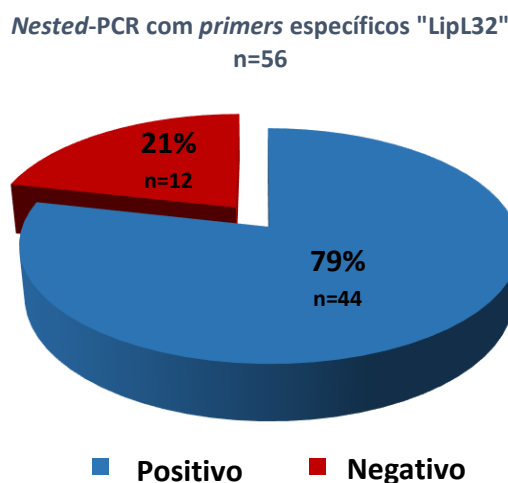


Figura 3.32 – Representação gráfica dos resultados obtidos nas amostras processadas pela *nested*-PCR com *primers* específicos “LipL32”.

Quanto à distribuição por distrito, os resultados permitiram observar que do total de 38 amostras dos roedores capturados e avaliadas pela referida técnica (com *primers* específicos), para o distrito de Lisboa verificou-se a amplificação de DNA de *Leptospira* spp., em 84%, não tendo sido amplificado DNA de espécies patogénicas nas restantes seis amostras (16%), (Fig. 3.33). No que respeita ao material biológico oriundo de roedores do distrito de Setúbal verificou-se amplificação de DNA de leptospiros de espécies patogénicas em 67% das amostras como se documenta na Fig. 3.34.

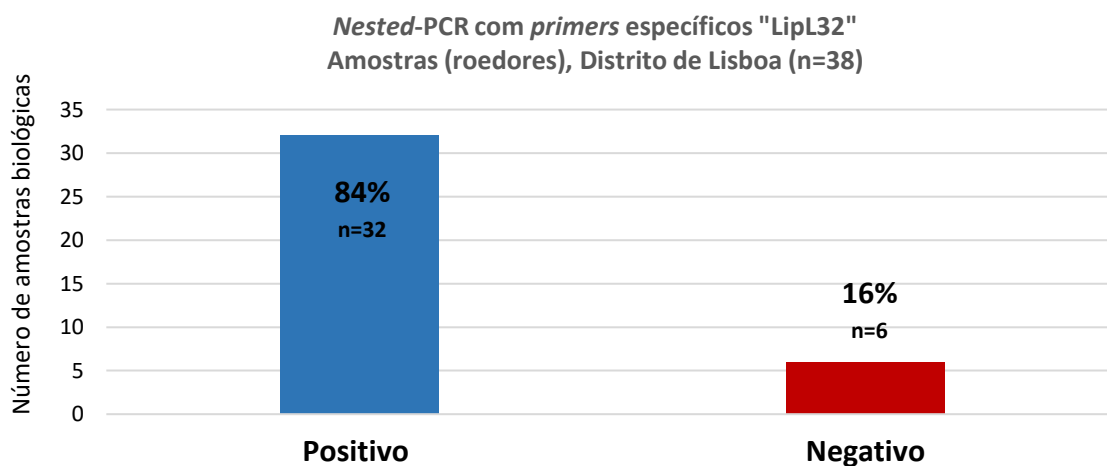


Figura 3.33 – Representação gráfica dos resultados do material biológico (roedores) do distrito de Lisboa que foram submetidas ao protocolo de *nested*-PCR com *primers* específicos “LipL32”.

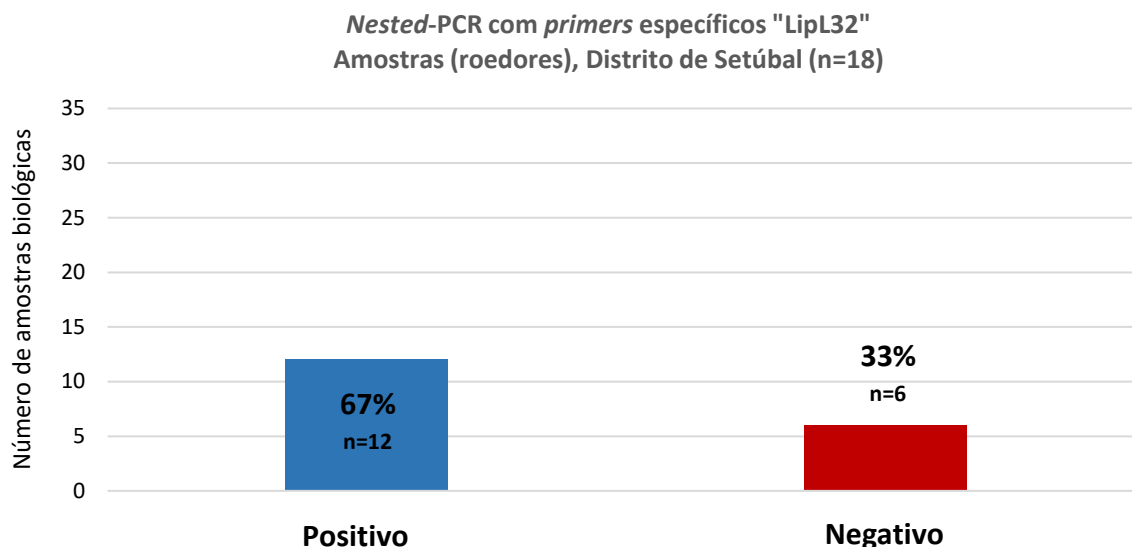


Figura 3.34 - Representação gráfica dos resultados do material biológico (roedores) do distrito de Setúbal que foram submetidas ao protocolo de *nested*-PCR com *primers* específicos “LipL32”

Quadro 9 - Resumo dos resultados obtidos nos diferentes *nested*-PCR para as amostras biológicas provenientes dos roedores.

	<i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> universais A e B (n=127)		<i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> específicos “LipL32” (n=56)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Lisboa	38	22	32	6
Setúbal	18	49	12	6
Total	56	71	44	12

3.4.6 – Cultura em meio de seletivo EMJH

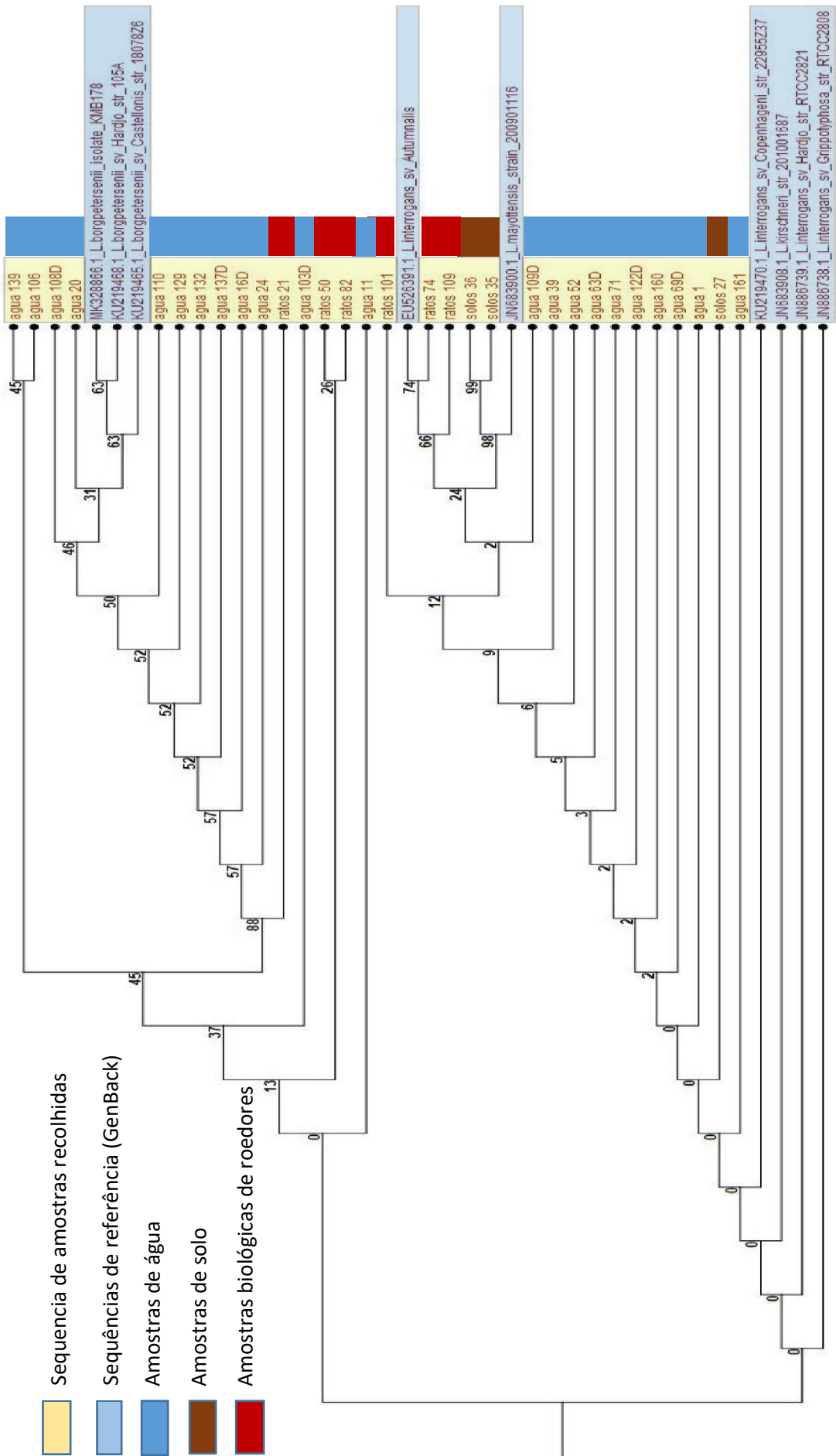
Das amostras biológicas recolhidas, como já referido, nove foram utilizadas para cultura em meio seletivo EMJH semissólido. Até à data em que se conclui a redação do presente manuscrito (ainda) não se verificou crescimento bacteriano em nenhuma das culturas.

3.5 - Sequenciação das amostras de água, solo e de amostras biológicas (roedores)

Após a receção dos resultados da sequenciação, estes foram analisados individualmente no programa BLAST, sendo possível observar os resultados obtidos no **ANEXO II**.

Foi também elaborada uma árvore filogenética, através do programa *CLC Genomics Workbench 12*, com os resultados da sequenciação, de modo a tentar-se compreender a evolução e correlação das amostras recolhidas (ambientais e de roedores) com as sequências disponíveis no GenBank (Fig. 3.35).

Figura 3.35 – Árvore filogenética, realizada no programa CLC Genomics Workbench 12, baseada no alinhamento do segmento do gene *lplL32*.
(Filogenia *Maximum-likelihood*; Modelo: *General Time Reversible*; Layout: *Cladograma*). A numeração presente na figura representa o grau de parentesco entre os diferentes taxas



IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A leptospirose continua a ser considerada uma doença zoonótica com uma larga distribuição mundial, sendo a sua incidência mais elevada em países tropicais e/ou em desenvolvimento, os quais reúnem características ótimas para a transmissão de bactérias do Género *Leptospira*. No entanto, havendo um ambiente minimamente favorável ao desenvolvimento e preservação destas bactérias, a possibilidade de infetar humanos e outros mamíferos torna-a uma preocupação re-emergente na atualidade.

Como já foi referido, a grande variedade de sintomas clínicos que caracterizam a leptospirose são, muitas vezes, semelhantes a sintomas causados por outros agentes patogénicos, o que pode provocar alguma confusão no diagnóstico clínico, fazendo com que esta doença seja muitas vezes subdiagnosticada. Devido à sua natureza infecciosa e às diferentes manifestações clínicas, a leptospirose pode evoluir rapidamente provocando complicações multissistémicas, podendo mesmo ser fatal.

É descrito na literatura que a água constitui o meio preferencial na transmissão das leptospiros aos humanos, dado que conseguem sobreviver por longos períodos de tempo em condições que lhes sejam relativamente favoráveis (Adler *et al.*, 2015). É igualmente entendido que os solos húmidos constituem outra fonte potencial de manutenção de leptospiros viáveis, as quais são capazes de infetar humanos e outras espécies animais. Esta é, pois, uma linha de estudo pioneira em Portugal, nunca tendo sido, até à presente data, estudadas em Portugal, amostras de solo no contexto da presença/ausência de espiroquetas do género *Leptospira*.

Os roedores são conhecidos como os reservatórios naturais mais importantes de leptospiros, sendo capazes de as dispersar, através da urina, durante toda a sua vida, fazendo com que sejam os principais “veículos” responsáveis pela contaminação do ambiente envolvente, o qual vai, por sua vez, ser preponderante na infeção dos humanos e outros mamíferos.

Em Portugal continental, os principais estudos realizados em leptospiros tiveram e têm por base amostras biológicas humanas ou de animais, havendo poucos estudos relativos à presença e distribuição geográfica das referidas bactérias, em coleções de água doce e roedores (reservatórios naturais), capturados nas imediações das mesmas, o mesmo não acontecendo de todo, em amostras de solos.

Desta forma, e como já referido anteriormente, o presente estudo surgiu da necessidade de se ter uma perceção integrada da atual distribuição e taxa bacteriana de espiroquetas do género *Leptospira*, nomeadamente, as de carácter patogénico, nos distritos de Lisboa e Setúbal, de forma a compreender o conseqüente risco para a saúde das populações. Assim, considerou-se pertinente avaliar, em paralelo, amostras provenientes de coleções de água doce, de solos nas suas imediações, bem como de roedores locais.

Foram assim recolhidas 327 amostras de água, 96 de solos e 139 amostras biológicas de roedores provenientes de diferentes zonas de ambos os distritos. Tendo em conta a grande extensão geográfica da área de estudo, não foi possível recolher amostras representativas de todos os concelhos devido à escassez temporal para o efeito.

Todas as amostras de água foram recolhidas à superfície das respetivas coleções devido à natureza aeróbia das bactérias em estudo e, como é descrito na literatura (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001), a sobrevivência das mesmas está normalmente associada a parâmetros físico-químicos tais como o valor de pH, tipologia da água e temperatura da mesma e atmosférica, entre outros.

Desta forma, ao analisar todas as amostras de água, verificou-se que a grande maioria das mesmas (73%) apresentava valores de pH=7, não havendo uma diferença estatisticamente significativa no valor deste parâmetro, nas amostras obtidas dos dois distritos. Tendo em conta que, as leptospiros aquando sob condições abióticas, se mantêm viáveis com valores de pH neutro a ligeiramente alcalino (Faine *et al.*, 1999; Andre-Fontaine, 2015), podemos afirmar que a elevada quantidade de amostras com pH=7 recolhidas, vai de encontro às exigências preferenciais conhecidas para a sobrevivência da bactéria em estudo. Com o resultado do teste exato de Fisher ($p < 0,001$) confirmou-se a existência de associação entre os valores de pH registados e a presença ou ausência de bactérias do Género *Leptospira*.

Foi realizada a mesma análise para a tipologia da água, onde a percentagem de amostras recolhidas em coleções de água corrente foi significativamente mais elevada e, tendo em conta o resultado obtido, realizou-se o teste Qui-quadrado para verificar a associação entre a referida tipologia e a presença ou ausência de leptospiros, tendo-se confirmado existir uma associação estatisticamente significativa entre as duas variáveis ($p < 0,001$). Esta associação pode ser explicada pelo facto de a água corrente apresentar níveis de oxigenação mais elevados, comparativamente com coleções de água estagnada e/ou parada, e sendo as leptospiros, bactérias aeróbias obrigatórias (Levett, 2001), é espectável que a presença da mesma seja mais elevada em coleções com uma tipologia de água corrente, naturalmente com uma maior oxigenação.

Relativamente à deteção de DNA de bactérias do Género *Leptospira*, verificou-se que, em aproximadamente 50%, do total de amostras analisadas, houve amplificação de DNA leptospírico. Foi também possível observar uma diferença estatisticamente significativa, na amplificação de DNA entre as amostras obtidas nos dois distritos em estudo, tendo o distrito de Lisboa apresentado duas vezes mais amostras amplificadas para DNA leptospírico quando comparado com o distrito de Setúbal, o que nos indica que, a possibilidade de um contacto humano com coleções de água que contêm DNA das referidas bactérias, é potencialmente superior no distrito de Lisboa do que no distrito de Setúbal.

Apesar desta constatação, ao analisarem-se os resultados de amplificação de DNA de espécies patogénicas de *Leptospira*, podemos inferir que as amostras obtidas no distrito de Setúbal, mesmo considerando que foram apenas 50% de amostras com amplificação de DNA para o Género *Leptospira*,

mostraram quase o mesmo número de amostras positivas para DNA de leptospiros patogénicas quando comparado com o distrito de Lisboa. Com este resultado podemos inferir que, caso haja contacto humano com coleções de água que contenham bactérias do Género *Leptospira* a probabilidade de estas serem patogénicas é significativamente maior no distrito de Setúbal do que no distrito de Lisboa, o que pode significar um maior risco de infeção por estas bactérias, na referida área geográfica.

No que respeita às amostras de solo, as mesmas foram recolhidas nunca ultrapassando 5 cm de profundidade devido, uma vez mais, à natureza aeróbia das leptospiros, sendo que a maior parte das amostras foram recolhidas posteriormente às amostras de coleções de água doce. Sendo este um estudo pioneiro em Portugal e, por isso, com pouca informação disponível na literatura, acerca da taxa bacteriana de espiroquetas do género *Leptospira* neste tipo de amostras ambientais, definiu-se que as mesmas seriam coletadas na proximidade dos locais anteriormente utilizados para a recolha de amostras de água, havendo assim a possibilidade de estabelecer uma relação entre os resultados obtidos em ambos os tipos de amostras (água e solos).

À semelhança das amostras de água, verificou-se que o valor de pH das várias amostras de solo foi maioritariamente (83%) igual a 7, não havendo uma diferença estatisticamente significativa neste parâmetro quando se compararam amostras dos dois distritos, tendo umas e outras, apresentado uma maior percentagem de amostras com pH=7. Foi inferido pela análise estatística que, tal como outros estudos comprovam (Khairani-Bejo, 2004), existe associação entre os valores de pH registados e a presença ou ausência de bactérias do Género *Leptospira*, após determinação do valor de “p” do teste exato de Fisher ($p<0,001$).

Ao analisar o nível de humidade em todas as amostras recolhidas, verificou-se que a maioria das mesmas se situou entre o nível de “pouco húmido (nível 2)” e o nível de “muito húmido (nível 4)”. Pela observação do resultado do teste exato de Fisher ($p<0,001$), verificou-se existir associação estatística entre o nível de humidade presente no solo e a presença ou ausência de leptospiros, o que vai de encontro aos resultados obtidos em estudos semelhantes realizados em países como as Filipinas e Japão (Saito, 2013) e Brasil (Schneider, 2018).

Na deteção de DNA de bactérias do Género *Leptospira*, com *primers* universais, verificou-se que na totalidade das amostras analisadas, a grande maioria apresentou amplificação de DNA leptospírico, sendo que, quando se analisaram separadamente as amostras provenientes dos dois distritos, as mesmas também apresentaram resultados semelhantes. No entanto, quando analisados os resultados da amplificação de DNA leptospírico correspondente a espécies de leptospiros patogénicas, foi possível inferir que apenas uma percentagem muito baixa correspondia a leptospiros patogénicas. Este resultado pode ser explicado pelo facto de que, a este tipo de amostras ambientais, possa estar mais associado a leptospiros saprófitas e/ou intermédias do que a patogénicas, daí existir uma elevada quantidade de DNA amplificado com *primers*

universais (A e B) e numero de amostras bastante mais reduzido quando avaliado com *primers* específicos “LipL32”, os quais apenas detetam leptospiros patogénicas (Schneider, 2018). Não deve ser, porém, também descartado o facto de poder existir um maior número de contaminantes no solo, o que pode interferir com a reação de PCR, sendo interessante, em estudos futuros, tentar melhorar o protocolo de PCR para este tipo de amostras ambientais.

Apesar de não causarem um quadro clínico tão grave quanto as patogénicas, as leptospiros de espécies intermédias continuam a ser uma preocupação para a saúde pública, tendo em conta que existem caso de infeção provocados pelas mesmas, tendo mesmo sido isoladas algumas espécies a partir de humanos infetados. (Arzouni *et al.*, 2002; Chiriboga *et al.*, 2015)

No que respeita aos roedores e sendo estes os principais reservatórios naturais e, consequentemente, os principais disseminadores de leptospiros no ambiente, a escolha dos locais de captura dos mesmos assentou na necessidade de se obter uma comparação entre os resultados obtidos nas amostras ambientais e as amostras biológicas dos roedores capturados, de forma a entender-se a dispersão destas bactérias e o papel dos reservatórios na disseminação das mesmas no ambiente.

Tratando-se de capturas de animais silváticos, não foi possível controlar o número de espécimes nem a espécie a capturar, tendo havido mesmo locais onde não foi possível a captura de nenhum exemplar. No entanto, em ambos os distritos, e por coincidência, o número de espécimes capturados foi igual, assim como também as espécies capturadas (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*) foram as mesmas. As capturas foram realizadas entre o pôr e o nascer do sol, devido ao facto de serem animais noturnos e assim se aumentar a possibilidade de captura como descrito por Hut, em 2011. Verificou-se que, o canavial, saída de esgoto e zona com arbustos, foram os locais onde se capturaram mais roedores, o que pode ser explicado pelo facto destes estarem normalmente associados a locais próximos de coleções de água e com uma flora consideravelmente densa, o que lhes oferece proteção contra possíveis predadores.

Devido à não autorização legal, não foi possível efetuar o transporte dos animais vivos desde o local de captura até ao laboratório do IHMT. Assim, todos os parâmetros morfológicos e morfométricos bem como a necropsia de todos os espécimes foram realizados no local da captura, em condições difíceis e improvisadas, mas tentando-se sempre manter o máximo de condições de assepsia e cumprimento das regras do bem estar animal.

Após a sexagem, verificou-se que a grande maioria dos espécimes capturados eram machos, podendo este resultado ser justificado pelo facto de os machos percorrerem uma área maior para defenderem o território ao mesmo tempo que procuram novas fêmeas para acasalar.

Quando observados os resultados da amplificação de DNA de bactérias do Género *Leptospira*, nas amostras dos roedores, verificou-se que, da totalidade das amostras analisadas, aproximadamente 50%

apresentou amplificação de DNA, tendo sido o fígado, rim e pulmão os órgãos de cujas amostras se obteve o maior número de resultados positivos. Foi também possível verificar uma diferença estatisticamente significativa nos resultados da amplificação de DNA leptospírico entre amostras de roedores capturados nos dois distritos, sendo que o maior número de amostras com amplificação de DNA leptospírico eram oriundas do Distrito de Lisboa comparativamente com as obtidas dos roedores capturados no Distrito de Setúbal. Estes resultados vão ao encontro dos já obtidos nas coleções de água, o que pode traduzir que, como referido anteriormente, os roedores têm, como é reconhecido, um papel fundamental na disseminação das referidas bactérias no ambiente (Bharti *et al.*, 2003; Minter A. *Et al.*, 2018).

Relativamente à deteção de DNA leptospírico correspondente a espécies patogénicas de *Leptospira* foi possível inferir que a maioria das amostras apresentou amplificação. Tendo em conta que, como já mencionado, as espécies identificadas têm um reconhecido tropismo para os seus reservatórios naturais, era esperado que os mesmos mostrassem uma elevada taxa de leptospiros patogénicas; por outro lado, constatando-se também que o rim foi um dos órgãos com maior presença de leptospiros, facto sobejamente conhecido, e que através da urina, estas bactérias são facilmente disseminadas no ambiente abiótico (águas, solos, superfícies), constituindo assim preocupação para a saúde pública (Bharti *et al.*, 2003; Minter A. *Et al.*, 2018).

Com os resultados obtidos, através da análise pelo BLAST, verificou-se que os diferentes tipos de amostras (água, solos e roedores) partilham as mesmas genoespécies de *Leptospira* (*L. interrogans* e *L. borgpetersenii*), o que pode indicar uma relação entre elas.

Da observação da árvore filogenética, foi possível verificar a existência de dois grupos principais, no grupo superior, com maior predominância de *L. borgpetersenii* e com algum, apesar de reduzido, grau de similaridade com amostras de água e de roedores, o que está de acordo com os resultados obtidos pela análise das sequências no BLAST. No grupo inferior, é possível inferir que o grau de similaridade, entre as amostras de água, a amostra de solo 27 e as sequências de referência depositadas no *GenBank*, como é o caso das espécies *L. kirschneri* e *L. interrogans* (com os três serovares diferentes), foi quase nulo. No entanto, as amostras de solo 35 e 36, apesar de provenientes do mesmo distrito e concelho, foram recolhidas em zonas distintas e apresentam (o seu DNA) um elevado grau de similaridade entre si, mas também com a espécie *L. mayottensis*, originária de Maiote, facto este, que merece atenção em estudos futuros, dada a distância geográfica da referida espécie. Foi também possível observar algum grau de similaridade entre as amostras de roedores (rato 74 e rato 109) com o serovar Autumnalis de *L. interrogans*, facto a que não será alheia a conhecida presença do referido serovar em Portugal continental, como já demonstrado em estudo anteriores na população humana (Vieira, 2006; Vieira *et al.*, 2006).

Como já referido, sendo este um estudo pioneiro em Portugal, era esperada uma dificuldade acrescida na comparação das amostras recolhidas no contexto de análise filogenética, dada a ausência de

sequências de referência depositadas na base de dados e relativas ao país. Outra explicação possível para o reduzido grau de homologia verificado entre as diferentes amostras recolhidas pode dever-se ao facto da região molecular utilizada para o alinhamento das sequências não apresentar diversidade suficiente para determinar corretamente, as referidas relações entre os *taxa*.

Das amostras de tecido renal dos espécimes de roedores capturados, mantidas em cultura em meio seletivo EMJH semissólido, com o objetivo de isolar o agente bacteriano, até à data da conclusão da presente Dissertação, nenhum dos tubos de cultura mostrou crescimento bacteriano, o que não surpreende dado as conhecidas dificuldades de crescimento *in vitro* das leptospiros que se sabe ser fastidioso e lento, pelo que se admite que o mesmo possa ainda ocorrer, o que a verificar-se daria maior robustez aos resultados moleculares obtidos. No entanto, em estudos futuros, seria relevante melhorar/otimizar as técnicas utilizadas, como por exemplo, iniciar o protocolo de cultura no terreno (no decurso do trabalho de campo) ou utilizar um produto mais favorável à preservação destas bactérias, durante e após a necropsia.

Como resumo da investigação realizada, admitimos poder concluir que: *i)* existe uma taxa elevada de bactérias patogénicas do Género *Leptospira* presente em coleções de água doce e solos de diversas zonas dos Distritos de Lisboa e de Setúbal; *ii)* é igualmente elevada a probabilidade de ocorrer uma infeção por esta bactéria, através do contacto da população com as referidas coleções de água; e, *iii)* pela primeira vez, em Portugal, foi estudada a potencial contaminação leptospírica dos solos.

Assim, neste contexto, é de extrema importância alertar as Autoridades de Saúde competentes para esta realidade, de modo a prevenir o risco de infeção por *Leptospira* spp. a par de uma contribuição efetiva para o diagnóstico atempado, caso ocorra a infeção.

É ainda de considerar a reconhecida prevalência de roedores no ciclo epidemiológico da leptospirose, cujas populações importa controlar mais eficazmente, sobretudo em espaços urbanos e periurbanos de modo a evitar a evidência do risco no âmbito da Saúde global.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha, P. N., and B. Szyfres. 2003. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. 3^{ed}, Pan American Health Organization. Washington, USA

Adler, B., and A. de la Peña-Moctezuma. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. Vet. Microbiol, 140 (3-4): 287-96.

Adler, B. 2015. History of Leptospirosis and *Leptospira*. In: Adler B, editor. *Leptospira* and Leptospirosis. Vol 387, pp. 1–9. Springer-Verlag; Heidelberg, Germany.

Aldeia, A. M. S. 2016. Identificação molecular de bactérias do género *Leptospira* em coleções de água doce no distrito de Leiria. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

Andre-Fontaine, G., Aviat, F. Thorin, and C. Water. 2015 borne leptospirosis: survival & preservation of the virulence of pathogenic *Leptospira* spp. in fresh water. Curr. Microbiol. 71, 136–142.

Arzouni, J. P., P. Parola, B. La Scola, D. Postic, P. Brouqui, and D. Raoult. 2002. Human Infection Caused by *Leptospira fainei*. Emerg Infect Dis 8: 865–868.

Ayanegui-Alcerreca, M. A., P. R. Wilson, C. G. Mackintosh, J. M. Collins-Emerson, C. Heuer, A. C. Midwinter, and F. Castillo-Alcala. 2007. Leptospirosis in farmed deer in New Zealand: a review. N Z Vet J. 55(3): 102-108.

Bharti, A. R., J. E. Nally, J. N. Ricaldi, M. A. Mathias, M. M. Diaz, and M. A. Levett. 2003. Reviews Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infect Dis, 3: 757-71.

Céspedes, M. 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica y reemergente: Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, vol. 22 no. 4. Espanha.

Chiriboga, J., V. Barragan, G. Arroyo, A. Sosa, D. N. Birdsell, K. España, A. Mora, E. Espín, M. E. Mejía, M. Morales, C. Pinargote, M. Gonzalez, R. Hartskeerl, P. Keim, G. Bretas, and J. N. S. Eisenberg. 2015 High Prevalence of Intermediate *Leptospira* spp. DNA in Febrile Humans from Urban and Rural Ecuador. Emerg Infect Dis 21: 2141– 2147.

Collares-Pereira, M. 1994. *Leptospira* e Leptospirose: Epidemiologia e Diagnóstico Laboratorial. Cad de Doen Infec, III:19-28.

Collares-Pereira, M., H. Korver, W. J. Terpstra, M. Santos-Reis, M. G. Ramalhinho, M. L. Mathias, M. M. Oom, R. Fons, R. Libois, and F. Petrucci-Fonseca. 1997. First epidemiological data on pathogenic leptospires isolated on the Azorean islands. Eur J Epidemiol. 13(4):435-441.

Collares-Pereira, M., M. Santos-Reis, L. Gonçalves, M. L. Vieira, and L. Flor. 2008. Epidemiology and control of leptospirosis in the Azores Project. Final scientific report (USA Scientific Cooperative Agreement No. 58-401-3-F185)

Costa, F., J. E. Hagan, J. Calcagno, M. Kane, P. Torgerson, M. S. Martinez-Silveira, C. Stein, B. Abela-Ridder, and A. I. Ko. 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis. 9(9): e0003898.

Crespo, A. 2012. Controlo de Pragas no Jardim Zoológico de Lisboa - Particular Relevância Para o Controlo de Roedores e Sua Infecção Parasitária. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

Dutta, T. K., and M. Christopher. 2005. Leptospirosis - An Overview. JAPI. 53:545-551.

European Centre for Disease Prevention and Control. 2018. Leptospirosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm.

Evangelista, KV, and Coburn J. 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future Microbiol. 5(9):1413–1425.

Faine, B. Adler, C. Bolin, and Perolat. 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd Edition A. MediSci Writing, Armadela Vic,ed. 236 pp. Melbourne, Australia.

Farrar, J., N. J. White, P. J. Hotez, T. Junghanss, D. Laloo, and G. Kang. 2014. Manson's Tropical Diseases. 23ªed pp433-440, Elsevier Saunders. China.

Fauci, A. S., E. Braunwald, D. L. Kasper, S. L. Hauser, D. L. Longo, J. L. Jameson, and J. Loscalzo. 2008. Harrison Medicina Interna. McGraw-Hill 17ª ed, pp1048-1051. Rio de Janeiro.

- Gonçalves, A. T. S.** 2009. Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira* spp. e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica, Faculdade de Medicina de Lisboa, Universidade de Lisboa.
- Gonçalves, A. T., C. Paiva, F. Melo-Mota, M. L. Vieira, T. Carreira, M. S. Nunes, L. Mota-Vieira, A. Ahmed, R. A. Harstkeerl, K. Hyde, and M. Collares-Pereira.** 2010. First isolation of human *Leptospira* strains, Azores, Portugal. *Int J Infect Dis.* 14(3):148-153.
- Hartskeerl, R.A., M. Collares-Pereira, and W. A. Ellis.** 2011. Emergence, control and reemerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect.* 17(4):494-501.
- Hut, R. A., V. Pilorz, A. S. Boerema, A. M. Strijkstra, and S. Daan.** 2011. Working for Food Shifts Nocturnal Mouse Activity into the Day. *PLoS ONE* 6(3): 17527.
- Hüttner, M. D., H.C.P. Pereira, and R.M. Tanaka.** 2002. Pneumonia por leptospirose. *J. Pneumologia* v.28, n.4 São Paulo.
- Johnson, R.C, and P. Rogers.** 1964. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospirae with 8-azaguanine. *J Bacteriol*, 88: 1618-23.
- Kelley, P. W.** 1998. Leptospirosis. In: Gorbach, S. L., J. G. Bartlett, N. Blacklow. *Infectious diseases*. 2nd ed, pp1580-1587, W. B. Saunders. Philadelphia.
- Khairani-Bejo, S., A. R. Bahaman, M. Zamri-Saad, and A. R. Mutalib.** 2004. The survival of *Leptospira interrogans* in the Malaysian environment. *J Anim Vet Adv* 3: 123–129.
- Ko, A. I., C. Goarant, and M. Picardeau.** 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 736–747.
- Levett, P. N.** (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 14(2): 296-326.
- Levett, P. N., and L. Smythe.** 2008. International Committee on Systematics of Prokaryotes. *Int J Syst and Evol Microbiol*, 58:1049-50.

- Lilenbaum, W., R. Varges, P. Ristow, A. Cortez, S. O. Souza, L. J. Richtzenhain, and S. A. Vasconcellos.** 2009. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci.* 87(1): 16-19.
- Maele, I., A. Claus, F. Haesebrouck, and S. Daminet.** 2008. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet Rec.* 163(14): 409-13.
- Marinho, M., and T. C. Cardoso.** 2014. Pathogenesis of Leptospirosis: Important Issues. *Med Microb Diagn.* 4(1):1000-127.
- Mwachui, M. A., L. Crump, R. Hartskeerl, J. Zinsstag, and J. Hattendorf.** 2015. Environmental and behavioural determinants of leptospirosis transmission: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003843.
- Mérien, F., P. Amouriaux, P. Perolat, G. Baranton, and I. S. Giron.** 1992. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp. in Clinical Samples. *J Clin Microbiol.* 30(9): 2219-2224.
- Minter, A., P. J. Diggle, F. Costa, J. Childs, A. I. Ko, and M. Begon,** 2018. A model for *Leptospira* dynamics and control in the Norway rat (*Rattus norvegicus*) the reservoir host in urban slum environments. *Epidemics.* J. Elsevier. 25: 1755-4365
- Morgan, J., S. L. Bornstein, A. M. Karpati, M. Bruce, C. A. Bolin, C. C. Austin, C. W. Woods, J. Lingappa, C. Langkop, B. Davis, D. R. Graham, M. Proctor, D. A. Ashford, M. Bajani, S. L. Bragg, K. Shutt, B. A. Perkins, and J. W. Tappero.** 2002. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, illinois, 1998. *Clin Infect Dis.* 34(12): 1593-1599.
- Mwachui, M. A., L. Crump, R. Hartskeerl, J. Zinsstag, and J. Hattendorf.** 2015. Environmental and behavioural determinants of leptospirosis transmission: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9.
- Pappas, G., P. Papadimitriou, V. Siozopoulou, L. Christou, and N. Akritidis.** 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis.* 12(4): 351-357.
- Plank, R., and D. Dean.** 2000. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infec.* 2(10):1265-76.

- Picardeau, M.** 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*. 43(1): 1-9.
- Randall, C.** 2001. General Pest Control 10^a General Pest Control: A Guide for Commercial Applicators M. State University Extension, ed., Michigan.
- Salwani, I., W. A. Noor, B. Norhidayah, R. A. Nor, C. C. Yeo and L. Z. Ahmad.** 2014. A Study on the Presence of Pathogenic *Leptospira* spp. In environmental water samples obtained from select recreational areas in Terengganu, Malaysia. *Res J Pharm and Tech*. 7: 1153-1157.
- Saito, M., S. Y. A. M. Villanueva, A. Chakraborty, S. Miyahara, T. Segawa, T. Asoh, R. Ozuru, N. G. Gloriani, Y. Yanagihara, and S. Yoshidaa.** 2013. Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Appl Environ Microbiol*. 79: 601–609.
- Schneider, M. C. , M. Jancloes, D. F. Buss, S. Aldighieri, E. Bertherat, P. Najera, D. I. Galan, K. Durski, and M. A. Espinal.** 2013. Leptospirosis: A Silent Epidemic Disease. *Int J Environ Res Public Health*. 10(12)7229-7234.
- Schneider, A. G., A. Casanovas-Massana, K. P. Hacker, Jr. E. A. Wunder, M. Begon, M. G. Reis, J. E. Childs, F. Costa, J. C. Lindow, and A. I. Ko.** 2018. Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. *PLoS Negl Trop Dis* 12(4).
- Shieh, W., E. Charles, and P. N. Levett.** 2006. Leptospirosis. In Elsevier/Churchill Livingstone, Philadelphia, ed. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, & Practice*, 2nd Edition, 1721 pp. Churchill Livingstone: Elsevier/Churchill Livingstone, Philadelphia.
- SRAFAM (DSAP).** 2012. Manual de boas práticas de controlo de roedores na região autónoma nos Açores.
- Sunil, S., J. Jacob, and B. Varghese.** 2016. Human Leptospirosis - a review. *World J of Pharmaceut Res*. 5(4):613-624.
- Thibeaux, R., G. Iraola, I. Ferrés, E. Bierque, D. Girault, M. E. Soupé-Gilbert, M. Picardeau, and C. Goarant.** 2018. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *J. Microb Genom*. 4(1): e000144.
- Verma, A., B. Stevenson, and B. Adler.** 2013. Leptospirosis in horses. *Vet Microbiol*. 167(1-2): 61-66.

Vieira, M. L. 2006. Aspetos da Caracterização Antigénica e Molecular da Leptospirose em Áreas Endémicas. Tese de Doutoramento em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 301 pp.

Vieira, M. L., M. J. Gama-Simões, and M. Collares-Pereira. 2006. Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis.* 10(5):378-386

Vijayachari, P., A. P. Sugunan, and A. N. Shriram. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J of Biosc.* 33(4): 557-69.

Vinetz, J. M. 2001. Leptospirosis. *Cur Opin Infect Dis.* 14(5): 527-538.

Xu, Y., and Q. Ye. 2018. Human leptospirosis vaccines in China. *Hum Vaccin Immunother.* 14(4): 984–993.

Wang, C., L. John, T. Chang, W. Cheng, M. Luo, and A. Hung. 1965. Studies on anicteric leptospirosis. I. Clinical manifestations and antibiotic therapy. *J. Chin Med.* 84:283-291.

Witmer, G. W., H. Martins, and L. Flor. 2004. Leptospirosis in the Azores: the Rodent Connection. *Univ. of Calif.* pp217-220.

World Health Organization. 2003. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. WHO. Geneva, Switzerland

World Health Organization. 2010. Report of the First Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. WHO. Geneva, Switzerland

Wuthiekanun, V., W. Chierakul, D. Limmathurotsakul, L. D. Smythe, M. L. Symonds, M. F. Dohnt, A. T. Slack, R. Limpaiboon, Y. Suputtamongkol, N. J. White, N. P. J. Day, and S. J. Peacock. 2007. Optimization of Culture of *Leptospira* from Humans with Leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 45(4): 1363-1365.

VI. ANEXOS

ANEXO I

Autorização Ética (CEFCM) e Legal (ICNF) para a realização deste estudo.

Decisão final sobre o projecto "Detecção e identificação de bactérias do género Leptospira em amostras ambientais e em pequenos mamíferos de dois distritos de Portugal através de abordagens moleculares"

A Comissão de Ética da NMS|FCM-UNL (CEFCM) decidiu, por unanimidade, aprovar o projecto de investigação intitulado "Detecção e identificação de bactérias do género Leptospira em amostras ambientais e em pequenos mamíferos de dois distritos de Portugal através de abordagens moleculares" (nº07/2019/CEFCM), submetido por Doutora Maria Luiza Vieira.

Lisboa, 26 de Março de 2019

O Presidente da Comissão de Ética,



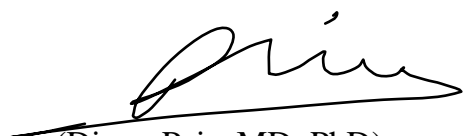
(Prof. Doutor Diogo Pais)

TO WHOM IT MAY CONCERN

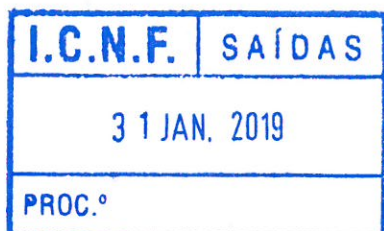
The Ethics Research Committee NMS|FCM-UNL (CEFCM) has unanimously approved the Project entitled "Detecção e identificação de bactérias do género Leptospira em amostras ambientais e em pequenos mamíferos de dois distritos de Portugal através de abordagens moleculares" (nr.07/2019/CEFCM), submitted by Maria Luiza Vieira MSc/ PhD.

Lisbon, March 26th, 2019

The Chairman of the Ethics Research Committee,



(Diogo Pais, MD, PhD)



Exmo. Senhor
Dr. Filipe Fernandes Delgado
Instituto de Medicina Molecular
Av. Professor Egas Moniz
1649-028 Lisboa

SUA REFERÊNCIA
Correio eletrónico

SUA COMUNICAÇÃO DE
28jan2019

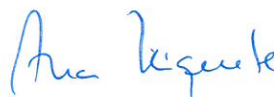
NOSSA REFERÊNCIA
6175/2019/DRNCN/DGEFF

ASSUNTO LICENÇA PARA CAPTURA E EUTANÁSIA DE ROEDORES (VERSÃO CORRIGIDA)

Junto se envia a versão corrigida da licença para captura e eutanásia de roedores.

Com os melhores cumprimentos,

A Diretora do Departamento de Recursos Naturais e
Conservação da Natureza,



Ana Zúquete

Anexo: O original da licença 240/2019/CAPT (2ª VIA).

LICENÇA Nº 240 / 2019 / CAPT (MÉTODOS NÃO SELETIVOS) (2ª VIA)

LICENÇA PARA CAPTURA, MANUSEAMENTO E EUTANÁSIA DE EXEMPLARES DA FAUNA SELVAGEM NO TERRITÓRIO DE PORTUGAL CONTINENTAL AO ABRIGO DO DECRETO-LEI N.º140/99 DE 24 DE ABRIL, COM A NOVA REDAÇÃO DADA PELO DECRETO-LEI Nº 49/2005 DE 24 DE FEVEREIRO, ALTERADO PELO DEC.-LEI Nº 156-A/2013 DE 08 DE NOVEMBRO, E DO DECRETO-LEI N.º 316/89, DE 22 DE SETEMBRO.

TITULAR DA LICENÇA: Filipe Fernandes Delgado

CC: 13857876 1ZY3

ESPÉCIES EM CAUSA: *Mus musculus*, *Mus domesticus*, *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*

FINALIDADE E PROPÓSITOS: Projeto: “Aquisição de conhecimento sobre a prevalência de leptospiros em roedores silváticos de quatro distritos de Portugal Continental”

N.º DE ESPÉCIMES: 100 (cem) exemplares de cada uma das espécies, de ambos os sexos e com mais de 8 semanas, que serão eutanasiados

AMOSTRAS A RECOLHER: sangue, urina, fezes, rim e pulmão

MARCAÇÃO: sem aplicação

PERÍODO DE DURAÇÃO: até 31 de dezembro de 2019

FREGUESIAS E CONCELHOS: Concelho de Alcácer do Sal: freguesias de Alcácer do Sal e Santa Susana; Concelho de Alcochete: freguesias de Alcochete e Samouco; Concelho de Almada: freguesias de Almada, Cova da Piedade, Pragal, Cacilhas, Charneca da Caparica, Sobreda, Laranjeiro e Feijó; Concelho do Montijo: freguesias da Atalaia, Alto-Estanqueiro Jardim, Montijo e Afonsoeiro; Concelho de Setúbal: freguesias de S. Julião, N. Srª da Anunciada e Sta. Maria da Graça; Concelho do Barreiro: freguesias de Alto do Seixalinho, Sto. André, Verderena, Barreiro e Lavradio; Concelho da Moita: freguesias de Gaio-Rosário, Sarilhos Pequenos e Moita; Concelho de Palmela: freguesias de Palmela e Pinhal Novo; Concelho de Seixal: freguesias de Amora, Corroios, Seixal, Arrentela e Aldeia de Paio Pires; Concelho de Sesimbra: freguesia de Santiago; Concelho de Grândola: freguesias de Grândola, Sta. Margarida da Serra e Melides; Concelho de Lisboa: freguesias de Ajuda, Alcântara, Alvalade, Arroios, Avenidas Novas, Beato, Belém, Benfica, Campo de Ourique, Campolide, Estrela, Lumiar, Marvila, Misericórdia, Olivais, Parque das Nações; Penha de França, Sta. Maria Maior, Sto. António e S. Vicente; Concelho da Amadora: freguesias de Águas Livres, Alfragide, Falagueira – Venda Nova. Mina de Água e Venteira; Concelho de Mafra: freguesias da Encarnação, Ericeira, Mafra e Colares; Concelho de Sintra: freguesias de Belas, S. João das Lampas, Terrugem, Pero Pinheiro, S. Martinho, Sta. Maria e S. Miguel, Algueirão – Mem Martins, S. Pedro de Penaferrim e Rio de Mouro; Concelho e freguesia de Vila Franca de Xira; Concelho de Vila Velha de Ródão: freguesias de Vila Velha de Ródão, Fratel, Perais e Sarnadas de Ródão; Concelho de Castelo Branco: freguesias de Castelo Branco, Freixial e Juncal do Campo, Lardosa, Malpica do Tejo, Monforte da Beira, Sto. André das Tojeiras, S. Vicente da Beira e Sarzedas; Concelho de Belmonte: freguesias de Belmonte e Colmeal da Torre, Inguias, Caria e Maçainhas; Concelho de Proença-a-Nova: freguesias de Monte da Senhora, Sobreira Formosa e Alvito da Beira, Proença-a-Nova e Peral; Concelho do Fundão: freguesias de Bogas de Cima, Lavacolhos, Fundão, Valverde, Donas, Aldeia de Joanes, Aldeia Nova do

Cabo, Alconçosta, Vale de Prazeres, Mata da Rainha, Orca, Alpedrinha e Castelo Novo; Concelho de Oliveira de Frades: freguesias de Destriz e Reigoso, Oliveira de Frades, Souto de Lafões, Sejães, Pinheiro e Ribeiradio; Concelho de S. Pedro do Sul: freguesias de Manhouce, Pindelo dos Milagres, S. Pedro do Sul, Várzea e Baiões, Serrazes e Sul; Concelho de Tondela: freguesias de Tondela e Nandufe, Caparrosa e Silvaes, Ferreirós do Dão, Lajeosa do Dão; Concelho de Vila Nova de Paiva: freguesias de Touro, Vila Cova à Coelheira, Vila Nova de Paiva, Alhais e Fráguas; Concelho de Viseu: freguesias de Viseu, Lordosa, Silgueiros e Povolide; Concelho de Vouzela: freguesias de Campia, Cambra e Carvalhal de Vermilhas, Ventosa, Vouzela e Paços de Vilharigues, Fataunços e Figueiredo das Donas.

MÉTODOS A UTILIZAR: armadilhas tipo Sherman e Tomahawk

OUTRAS INDICAÇÕES OU LIMITES JULGADOS NECESSÁRIOS:

- No prazo máximo de 30 dias após o fim da validade da licença, o titular deverá apresentar, um relatório (em formato editável), no qual deve constar, obrigatoriamente, o número de exemplares capturados por local de captura (coordenadas no sistema de projecção ETRS89-PT-TM06), bem como os exemplares marcados, amostras recolhidas e ocorrência de mortalidade ou outras eventualidades associadas à licença emitida. A emissão de nova licença está condicionada à apresentação e apreciação deste relatório.
- As datas e locais previstos para as campanhas de capturas / recolhas a realizar no interior de Áreas Protegidas deverão ser comunicadas à respectiva AP com a antecedência de uma semana.
- A presente licença não inibe do cumprimento de qualquer outra legislação aplicável à ação em curso.

Lisboa, 30 de janeiro de 2019

A Diretora do Departamento de Recursos Naturais
e Conservação da Natureza



Ana Zuquete



ANEXO II

Resultados da análise das sequenciações no BLAST

Resultados da análise das sequenciações no BLAST

Número da amostra	Tipo de amostra	Resultado da sequenciação (BLAST)	Número da amostra	Tipo de amostra	Resultado da sequenciação (BLAST)	Número da amostra	Tipo de amostra	Resultado da sequenciação (BLAST)
1	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (100%)	106	Água	<i>Leptospira borgpetersenii</i> (97,37%)	27	Solo	<i>Leptospira interrogans</i> (99,32%)
11	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (100%)	108D	Água	<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Hardjo-bovis (99,29%)	35	Solo	<i>Leptospira interrogans</i> (92,23%)
16D	Água	<i>Leptospira borgpetersenii</i> (98.63%)	109D	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (99.29%)	36	Solo	<i>Leptospira interrogans</i> (93,33%)
20	Água	<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Hardjo-bovis (97.10%)	110	Água	<i>Leptospira borgpetersenii</i> (98,55%)	21	Ratos	<i>Leptospira borgpetersenii</i> (99,27%)
24	Água	<i>Leptospira borgpetersenii</i> (99.29%)	122D	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (100%)	50	Ratos	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (98,29%)
39	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (99.27%)	129	Água	<i>Leptospira borgpetersenii</i> (99,29%)	74	Ratos	<i>Leptospira interrogans</i> (97,58%)
52	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (98.68%)	132	Água	<i>Leptospira borgpetersenii</i> (99,29%)	82	Ratos	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (98,28%)
63D	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (98.68%)	137D	Água	<i>Leptospira borgpetersenii</i> (99,29%)	101	Ratos	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (98,24%)
69D	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (98.68%)	139	Água	<i>Leptospira borgpetersenii</i> (93,43%)	109	Ratos	<i>Leptospira interrogans</i> (98,59%)
71	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (98.68%)	160	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (100%)			
103D	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (97.83%)	161	Água	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni (98.67%)			

ANEXO III

Exemplar da tabela, utilizada em trabalho de campo, para a anotação das características no momento da colheita das amostras de água

Exemplar da tabela, utilizada em trabalho de campo, para a anotação das características no momento da colheita das amostras de água

[illegible]